Aus der Abteilung Pharmakologie
des Veterinärpharmakologischen Institutes
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. H. Kewitz

Untersuchungen über den Nucleinsäurestoffwechsel der Rattenleber

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin
an der
Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Otto Pleul

Tierarzt aus Plauen
Berlin 1965

Journal Nr. 528

1966

Aus der Abteilung Pharmakologie
des Veterinärpharmakologischen Institutes
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. H. Kewitz

Untersuchungen über den Nucleinsäurestoffwechsel der Rattenleber

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin
an der
Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Otto Pleul

Tierarzt aus Plauen

Berlin 1965

Journal Nr. 528

Gedruckt mit Genehmigung
der
Veterinärmedizinischen Fakultät
der
Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. J. Boch
Referent: Prof. Dr. H. Kewitz
Korreferent: Prof. Dr. Dr. K. Drepper

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 2. 1966

Inhaltsverzeichnis

Einleitung ..... S. 1

Tiermaterial, Analysenverfahren
und Substanzen ..... S. 5

1. Tiermaterial ..... S. 5
2. Durchführung der Adrenalektomie ..... S. 5
3. Messung der UV - Absorption ..... S. 5
4. Bestimmung von Phosphat ..... S. 6
5. RNS - Bestimmung mit Orcin ..... S. 6
6. DNS - Bestimmung mit Diphenylamin ..... S. 7
7. Extraktion der säurelöslichen
   Gewebsbestandteile ..... S. 7
8. Bestimmung der Radioaktivität ..... S. 7
9. Fraktionierung des Gewebes in Zellkerne
   und Cytoplasma ..... S. 8
10. Bestimmung der Tryptophanpyrrolase-
    aktivität ..... S. 9
11. Verwendete Substanzen ..... S. 10

Eigene Untersuchungen ..... S. 11

1. Versuche zur Reindarstellung von
   Nucleinsäuren ..... S. 13
2. Versuche mit radioaktiv markierten
   Vorstufen von Nucleinsäuren ..... S. 25

3. Untersuchungen über den Einfluß des Nahrungsentzuges auf den Einbau von Orotsäure - 5 - H-3 in die RNS ..... S. 39

4. Untersuchungen über den Einfluß der Adrenalektomie und des Glucocorticoids Prednisolon auf die Inkorporation von Orotsäure - 5 - H-3 und Thymidin - 2 - C-14 in die Nucleinsäuren der Rattenleber ..... S. 42

Besprechung der Ergebnisse ..... S. 45

Zusammenfassung ..... S. 54

Literaturverzeichnis ..... S. 56

Einleitung:

Auch die biochemischen Reaktionen, die zur Synthese von Proteinen und damit zur Bildung von Enzymen notwendig sind, kommen als Angriffspunkte für pharmakologische Wirkungen in Frage. Die Beeinträchtigung dieser Stoffwechselvorgänge durch Arzneimittel wurde der experimentellen Forschung jedoch erst in der letzten Zeit zugänglich, nachdem die Mechanismen der Eiweißbildung, zunächst in erster Linie durch Studien an Bakterienzellen, später auch an Warmblüterzellen, näher erkannt worden sind. Für die Pharmakologie wurde damit ein neues Gebiet eröffnet, das über die einzelnen Schritte der Nucleinsäurebildung und der Eiweißsynthese bis zu den Regulationen reicht, die die Funktionen der Zelle steuern. Im gegenwärtigen Stadium dieser pharmakologischen Forschungsrichtung ist es zunächst notwendig, einzelne Teile der Reaktionskette auf ihre Beeinflussung durch Arzneimittel zu studieren.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Umsatz von Nucleinsäuren, weil man darin eine für die Eiweißsynthese bedeutsame Schlüsselfunktion erblicken kann. Als Desoxyribonucleinsäure (DNS) stellen sie das chemische Material der Gene in den Zellkernen dar. In ihrer Zusammensetzung, d. h. in der für jedes Gen charakteristischen Aufeinanderfolge von Pyrimidin- oder Purinderivate enthaltenden, zum Makromolekül miteinander verknüpften Nucleotidbausteinen, ist die Aminosäurensequenz der Eiweiße genetisch festgelegt. Die Bildung der Eiweiße jedoch erfolgt im Cytoplasma an den sogenannten Ribosomen. Das sind Zellorganellen, die bei elektronenmikroskopischer Darstellung die Struktur von Körnchen besitzen und chemisch zur Hälfte aus Ribonucleinsäuren (RNS) bestehen. Dorthin müssen sowohl die Aminosäuren transportiert werden als auch die genetische Information aus dem Kern. Beides erfolgt ebenfalls mit Hilfe der RNS. Diejenigen, die den Transport der Aminosäuren

besorgen, sind mit Molekulargewichten von 80 000 bis 100 000 verhältnismäßig niedermolekular. Sie werden Transfer- oder soluble (s) RNS genannt. Andere, höher molekulare RNS, werden an den DNS des Kernes gebildet. In ihnen spiegelt sich die Basensequenz der DNS wider. Sie übertragen dadurch die genetische Information in das Cytoplasma zu den Ribosomen und heißen deshalb Messenger RNS. Nucleinsäuren nehmen also in diesem System an verschiedenen Stellen wichtige Funktionen wahr, so daß bei Eingriffen in ihren Stoffwechsel mit Auswirkungen auf die Eiweißbildung gerechnet werden muß.

Zur Untersuchung des Umsatzes körpereigener Substanzen benutzt man heute häufig die Markierung durch isotope Elemente. Wegen der leichteren Nachweisbarkeit werden dazu in erster Linie radioaktive Isotope, sogenannte Radionuclide, verwendet. Für viele Fragestellungen ist der Kohlenstoff mit der Massenzahl 14 (C-14) am besten geeignet. C-14 zerfällt mit einer Halbwertzeit von 5570 Jahren unter Abgabe von negativ geladenen Elektronen, sogenannten β^- - Teilchen oder Negatronen, die eine kinetische Energie von 0,158 Mega-Elektronen-Volt (MeV) enthalten. An dieser ionisierenden Strahlung kann der C-14 in einer geeigneten Apparatur erkannt und quantitativ bestimmt werden. Die Meßergebnisse werden als Atomzerfälle oder Transmutationen pro Minute (TPM) ausgedrückt und, bezogen auf eine bestimmte Substanzmenge, als "spezifische Aktivität" bezeichnet (TPM/Mol oder g). Das zweite in der biochemischen Forschung häufig verwendete Radionuclid ist das Tritium (H-3), d.h. Wasserstoff mit der Massenzahl 3. Seine Halbwertzeit ist mit 12,26 Jahren wesentlich kürzer, aber immer noch so lang, daß sie bei den üblichen Versuchsansätzen unberücksichtigt bleiben kann. H-3 ist ebenfalls ein β^- - Strahler, dessen ausgesendete Teilchen jedoch mit 0,018 MeV eine viel geringere Energie besitzen als C-14. Dadurch kann zwischen C-14 und H-3 unterschieden werden,

aber beim H-3 kommen Isotopie-Effekte eher in Frage als beim C-14. Isotopie-Effekte sind Wirkungen, die auf der größeren Massenzahl gegenüber dem gewöhnlich vorkommenden Nuclid des gleichen Elements beruhen. Die Massenzahl von C-14 ist nur um ca. 15% größer als die des gewöhnlichen Kohlenstoffs, während der radioaktive Wasserstoff drei mal so schwer ist wie der gewöhnliche. Man muß sich also in jedem Fall vergewissern, daß derartige Faktoren die Versuchsergebnisse nicht wesentlich beeinflussen. Bei den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen sind darauf beruhende Störungen nicht zu befürchten.

Man geht im allgemeinen so vor, daß man radionuclidenthaltende Stoffe appliziert, die vom Körper als Vorstufen für die Biosynthese der zu untersuchenden Substanz verwendet und somit eingebaut werden. Beim Studium der Nucleinsäuren können das zweckmäßigerweise die Vorstufen der Pyrimidin- oder der Purinbasen sein, die markierten Pyrimidin- oder Purinbasen selbst, die Nucleoside markierter Basen oder auch die Nucleotide der markierten Basen. Von diesen Vorstufen sind die Nucleotide für die Untersuchungen am Tier schlecht geeignet, weil sie zu langsam in die Zellen eindringen. Ansonsten kann selbstverständlich auch Phosphat benutzt werden, das radioaktiven Phosphor (P-32) enthält. Bei den nachstehenden Versuchen wurden die mit H-3 oder C-14 markierten Pyrimidinabkömmlinge Orotsäure, Uridin und Thymidin verwendet. Die Orotsäure war mit H-3 markiert, das den Wasserstoff am Kohlenstoff 5 des Pyrimidinringes ersetzt. Orotsäure wird im tierischen Organismus aus Carbamylphosphat und Asparaginsäure gebildet. Daraus entsteht das Orotidinmonophosphat (OMP), das durch Decarboxylierung in Uridinmonophosphat (UMP) umgewandelt wird. Aus UMP kann nach der Phosphorylierung zu UTP das Cytosin-haltige Nucleotid Cytidintriphosphat (CTP) werden. Dabei bleibt das Tritium-Atom des Pyrimidinringes erhalten. Wird aus UTP jedoch durch Methylierung

am Kohlenstoffatom 5 das Thymin enthaltende Nucleotid Thymidintriphosphat (TTP), dann verschwindet der radioaktive Wasserstoff aus dem Molekül, so daß die daraus gebildete DNS an dieser Stelle keine radioaktive Markierung aufweisen würde.

Thymidin stand in 2 verschiedenen radioaktiv markierten Formen zur Verfügung. Entweder war der Kohlenstoff Nr. 2 des Pyrimidinringes durch C-14 ersetzt oder der Wasserstoff der Methylgruppe durch H-3.
Das verwendete Uridin hatte den radioaktiven Wasserstoff nicht an einer definierten Position, sondern alle nicht leicht austauschbaren Wasserstoffatome konnten ersetzt sein, also auch der Wasserstoff im Riboseanteil.
Die beiden letzten Stoffe Thymidin und Uridin sind Riboside und treten infolgedessen über einen Weg in den Stoffwechsel der Nucleinsäuren ein, der nur im Nebenschluß liegt. Der Hauptweg führt direkt, wie weiter oben beschrieben, über die Nucleotide, wobei die Nucleoside nicht als Zwischenprodukte in Erscheinung treten.

Tiermaterial, Analysenverfahren und Substanzen

1. Tiermaterial

Die Versuche wurden mit weiblichen Albinoratten durchgeführt, deren Gewicht zwischen 125 und 250 g lag. Die Tiere stammten aus Zuchten der Firmen H. Hoffmann, Berlin, (Sprague Dawley) und Reupohl, Lage/Westf., (Firmenbezeichnung R 57). Die Fütterung erfolgte mit pelletiertem Alleinfutter der Firma Altrogge.

2. Durchführung der Adrenalektomie

Die Operation wurde 4 Tage vor dem Versuch in Äthernarkose durchgeführt. 1 - 2 cm lange Schnitte durch Haut und Fascien beiderseits der Wirbelsäule in Höhe der Nierenlager. Stumpfe Durchtrennung der Muskulatur mit einer Pinzette. Die extraperitoneal liegenden Nebennieren werden in die Operationswunde luxiert und unter Kompression der sie versorgenden Gefäße mit Hilfe einer gebogenen Pinzette mitsamt der Kapsel entfernt. Verschluß der Wunde mit Michelklammern.
Als Trinkwasser erhielten die Tiere 0,9 %-ige Kochsalzlösung.

3. Messung der UV-Absorption

Alle Messungen wurden mit dem Beckman-Spektrophotometer Modell DB in Quarzküvetten vorgenommen. Als Leerwert diente H_2O. Die Extinktion wurde bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums abgelesen. Zur Korrektur der durch andere Stoffe verursachten Absorption oder Trübung wurde die Extinktion bei 320 nm von der am Absorptionsmaximum abgelesenen subtrahiert. Aus der UV-Extinktion und dem Phosphorgehalt der Testlösung wurde der spezifische Extinktionskoeffizient

$$\varepsilon_P = \frac{E \cdot 31}{c \cdot d}$$

berechnet, wobei E die Extinktion, c die Phosphorkonzentration in g/Liter und d die Schichtdicke der Lösung bezeichnen.

4. Bestimmung von Phosphat, modifiziert nach Talvitie, Perez u. Illustre (33)

Ein aliquoter Teil der zu untersuchenden Lösung, der zwischen 5 und 50 γ P enthalten soll, wurde in ein Reagenzglas pipettiert und auf ein Volumen von etwa 0,5 ml eingeengt. Nach Zugabe von 1 ml 10 n H_2SO_4 sowie 0,5 ml 30 %-igem H_2O_2 wurde die Probe über Nacht bei 180°C im Sandbad verascht. Dabei verringerte sich das Volumen auf 0,5 ml. Anschließend wurden nacheinander 6,5 ml H_2O, 1 ml Vanadat-Reagens (0,02 m Ammonium-Metavanadat in 0,4 m Perchlorsäure) und 2 ml Molybdat Reagens (0,2 m Ammonium-Molybdat) dazugegeben und jedesmal gut durchmischt. Die Extinktion dieser Lösung wurde im Spektrophotometer bei 400 nm in 2 cm Glasküvetten gegen H_2O gemessen. Bei jeder Bestimmung wurden als Kontrolle einige Eichwerte mit steigenden Mengen einer Standard-KH_2PO_4-Lösung gemessen. 1 γ P entsprach bei dieser Methode einer Extinktion von 0,0182.

5. RNS-Bestimmung mit Orcin nach Barrenscheen u. Peham (1)

1 ml der zu untersuchenden Lösung, die 5 bis 50 γ RNS enthalten soll, wurde mit 1 ml Orcin-Reagens, bestehend aus

200 mg Orcin
10 ml 0,004 m $CuCl_2$-Lösung (34,1 mg $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ in 50ml 37 %-iger HCl)
90 ml 37 %-iger HCl,

40 min im siedenden Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 660 nm in 1 cm Glasküvetten gegen H_2O im Spektrophotometer gemessen.
Zu jeder Bestimmung wurde eine Kurve mit Hefe-RNS-Lösungen steigender Konzentration angefertigt, von der die Werte für die Testlösungen abgelesen wurden.
Orcin reagiert außer mit Ribose auch mit zahlreichen anderen Kohlehydraten, z.B. Glykogen und Desoxyribose. Die Bestimmung ist daher nur für quantitative RNS-Messungen verwendbar, wenn sichergestellt ist, daß die Lösungen frei von derartigen Beimengungen sind.

6. DNS-Bestimmung mit Diphenylamin nach Burton (2)

1 ml der zu untersuchenden Lösung, die 5 bis 80 γ DNS und 0,2 bis 0,5 n Säure enthalten soll, wurden mit 2 ml Diphenylamin-Reagens, bestehend aus

3 g Diphenylamin
100 ml Eisessig
1,5 ml konz. H_2SO_4
0,5 ml 2 %-igem Azetaldehyd,

16 bis 18 Stunden bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm in 1 cm Glasküvetten gegen H_2O im Spektrophotometer gemessen. Zu jeder Bestimmung wurde eine Eichkurve mit Lösungen von Lachssperma-DNS steigender Konzentration angefertigt, von der die Werte für die Testlösungen abgelesen wurden.

7. Extraktion der säurelöslichen Gewebsbestandteile

1 g Leber wurde in 10 ml H_2O unter Eiskühlung mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Die säurelöslichen Bestandteile wurden mit 10 ml 0,5 n Perchlorsäure bei 0°C gefällt, abzentrifugiert und 2 mal mit 20 ml 0,2 n Perchlorsäure gewaschen. Aus den vereinigten Überständen wurden aliquote Teile zur Bestimmung der UV-Extinktion bei 260 nm und der Radioaktivität entnommen.

8. Bestimmung der Radioaktivität

Alle Messungen wurden im Flüssigkeitsscintillations-Zähler Modell Tri-Carb Nr. 526 von der Firma Packard vorgenommen. Der Scintillator bestand aus einer Lösung von

100 g Naphthalin
10 g PPO (2,5-Diphenyloxazol)
0,1 g POPOP (1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol)

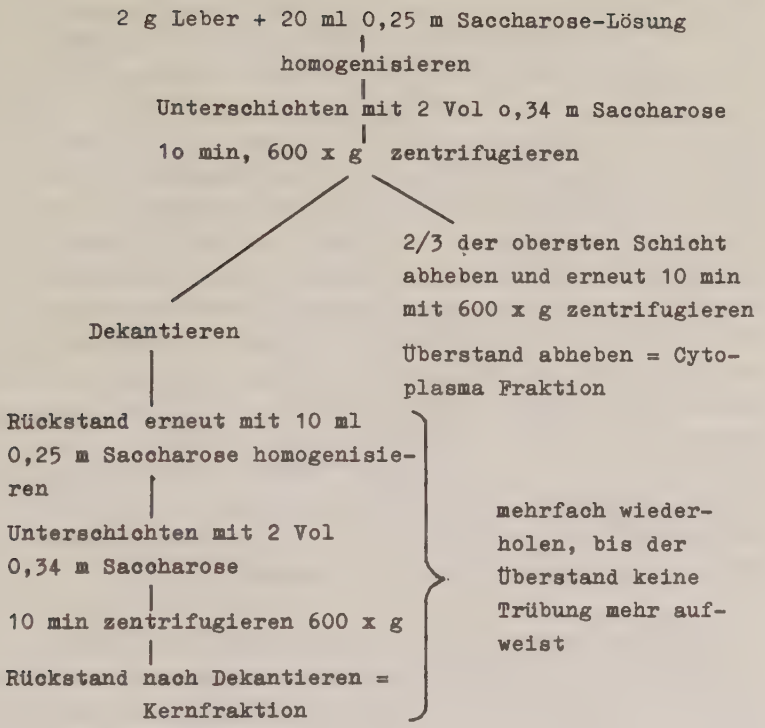
in 1000 ml Dioxan.

Das Prinzip der Impulszählung beruht darauf, daß jedes bei der Kernumwandlung freiwerdende Elektron beim Auftreffen auf ein geeignetes Molekül(Scintillator) seine kinetische Energie an dieses abgibt. Das Scintil-

latormolekül wird dadurch in einen angeregten Zustand versetzt, aus dem es sich unter Abgabe der Energie in Form von Lichtquanten wieder in den ursprünglichen Zustand verwandelt. Die Lichtblitze treffen auf einen Elektronenvervielfältiger und werden als verstärkte elektrische Impulse registriert.
Jedes Zählglas wurde mit 15 ml Scintillator-Lösung gefüllt und zur Feststellung der sogenannten O-Rate der Impulse (I_o) 10 min gemessen und erst danach zusätzlich mit 1 ml der zu untersuchenden Lösung bestückt. Die Lösungen dürfen nicht mehr als 0,5 n Säure oder Lauge enthalten. Bei Verwendung alkalischer oder stark salzhaltiger Lösungen entstand in der Scintillatorlösung ein Präcipitat,das mit Hilfe von thixotropem Gel (Cab-o-Sil) in eine stabile Emulsion verwandelt wurde.
Die Meßausbeute wurde durch erneute Messung unter Zusatz von C-14 - oder H-3 - markiertem Toluol bekannter Radioaktivität ermittelt. Die tatsächliche Zerfallsrate läßt sich dann leicht errechnen. Die Apparatur erlaubt es,die Aktivität von H-3 und von C-14 gleichzeitig in einer Probe an zwei getrennten Kanälen zu zählen, weil sich die Energie der Strahlung der beiden Radioisotopen fast um eine Zehnerpotenz unterscheidet.

9. Fraktionierung des Gewebes in Zellkerne und Cytoplasma nach Hogeboom, Schneider u. Striebich (15)

Die für die Zellfraktionierung vorgesehenen Lebern wurden vor der Entnahme zur Entfernung des Blutes von der Pfortader her nach Durchschneiden der unteren Hohlvene mit 0,25 m Saccharose-Lösung ausgespült. Alle Arbeitsgänge erfolgten bei 0 bis 4°C. Zum Homogenisieren diente ein Glas-Teflon - Homogenisator nach Potter-Elvehjem. Die Saccharose-Lösungen enthielten $2,5 \times 10^{-2}$m Tris-Puffer, pH 7,5 und $1,8 \times 10^{-3}$m $CaCl_2$ für die 0,25 m, $1,8 \times 10^{-4}$m $CaCl_2$ für die 0,34 m Saccharose-Lösung.



10. Bestimmung der Tryptophanpyrrolaseaktivität in der Modifikation nach Wagner(35)

0,5 bis 1 g Leber werden rasch entnommen und in der 27-fachen Menge einer gekühlten Pufferlösung mit dem "Ultra-Turax" eine Minute lang unter Kühlung homogenisiert.

Die Pufferlösung enthielt:

2 Teile 0,2 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,2
1 Teil 1,21 %-ige KCl-Lösung.

Darin waren 0,003 mol/l L-Tryptophan, das Substrat der Tryptophanpyrrolase, gelöst. Der Substratzusatz stabilisiert die Tryptophanpyrrolase, deren Aktivität andernfalls in vitro absinkt. Je 10 ml dieser Lösung wurden mit 0,04 ml einer 500 µmolaren Lösung von Hämatin in 1/125 n KOH versetzt, so daß eine 2 µmolare Endkonzentration von Hämatin vorlag. 15 ml des Homogenates kamen in ein vorgekühltes 25 ml - Erlenmeyerkölbchen. Die Inkubation erfolgte unter ständigem Schütteln in einem Wasserbad bei 38°C und 1 Atmosphäre Sauerstoffdruck. Nach 20 und nach 50 Minuten wurden je 4 ml entnommen und in je ein vorbereitetes Zentrifugenglas pipettiert, das 0,4 ml 45%-ige $HClO_4$ enthielt. Die auftretende Fällung wurde abzentrifugiert, und 3 ml des Überstandes wurden mit 0,5 ml 4 n KOH und 0,5 ml 3 m $KHCO_3$- Lösung auf pH 6,5 bis 7,0 gebracht. Bei + 4°C bildete sich erneut ein Niederschlag, der sich abfiltrieren ließ. Die Extinktion des klaren Filtrates wurde mit dem Filter Hg 366 nm im Eppendorfphotometer gemessen.

Der Extinktionsanstieg von 20 bis 50 Minuten ist durch die Erhöhung der Kynureninkonzentration im Homogenat bedingt. Daraus läßt sich die Aktivität der Tryptophanpyrrolase errechnen, die ausdrückt, wieviel Kynurenin pro Gramm Leberfrischgewicht innerhalb einer Stunde (µmol/g/h) gebildet wird.

11. Verwendete Substanzen

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad p r o a n a l y s i . Ausnahmen bildeten die Lachssperma-DNS, die die Kennzeichnung r e i n s t trug, sowie die von der Firma Packard bezogenen und mit S c i n t i l l a t i o n G r a d e ausgezeichneten Präparate PPO, POPOP und thixotropes Gel-Puder.

Eigene Untersuchungen

Eine veränderte Produktion von RNS kann auf zweierlei Weise zustande kommen. Einmal kann die Zahl der Produktionsstätten, d.h. der Anteil der an der Synthese beteiligten Zellen oder Zellorganellen, den Anforderungen entsprechend erhöht oder vermindert sein. Dies würde eine veränderte Konzentration von Ribonucleinsäuren im Gewebe bedingen. Die Geschwindigkeit der Synthese oder des Abbaues von RNS braucht dabei nicht verändert zu sein. Beim Angebot von markierten Vorstufen wäre der Anteil markierter Moleküle an der Gesamtzahl unverändert. Die als spezifische Aktivität bezeichnete Größe müßte sich dagegen ändern, wenn ein zweiter Mechanismus vorliegt, d.h. wenn die Nucleinsäuren schneller oder langsamer gebildet werden. Dies festzustellen, bedarf es der Reindarstellung der Nucleinsäuren, weil das die Voraussetzung für die Ermittlung der spezif. Aktivität ist. Dafür sind verschiedene Verfahren ausgearbeitet worden, von denen sich nicht alle für die Aufarbeitung von Lebergewebe eignen. Völlig zufriedenstellende Resultate liefert allerdings keine der bisher entwickelten Prozeduren. Deshalb wurden zunächst Versuche angestellt, um einen Aufarbeitungsgang zu finden, der der speziellen Aufgabe am besten angepaßt ist. Ausgangspunkte waren die Methoden von Schmidt-Thannhauser (30), von Schneider (31) und von Kirby (23-25).

Bei den beiden ersteren Verfahren werden die Nucleinsäuren hydrolysiert und dadurch nicht mehr mit Säuren fällbar, so daß sie gelöst bleiben. Vorher wird das Gewebshomogenat durch Waschung mit kalter Säure und dann mit Lipoidlösungsmitteln von niedermolekularen Anteilen und den einen zu hohen Phosphatgehalt vortäuschenden Phospholipoiden befreit. Die Schmidt-Thannhauser-Methode macht zur Trennung von der verschiedenen Resistenz der RNS und der DNS gegenüber der Laugenhydrolyse Gebrauch.

Bei Verwendung geeigneter Laugenkonzentrationen, Temperatur und Hydrolysezeit läßt sich die RNS in

säurelösliche Form überführen, während die DNS noch vollständig säurefällbar bleibt. Diese kann jedoch anschließend in Lauge gelöst und auf Grund ihres Gehaltes an Desoxyribose (und Phosphat) bestimmt werden. Bei dem Verfahren nach Schneider werden beide Nucleinsäuren gleichzeitig mit heißer Säure extrahiert und durch Ribose- und Desoxyribose-Bestimmung quantitativ erfaßt. Bei beiden Prozeduren werden die Nucleinsäuren zerstört und liegen als Gemische aus Oligo-, Di- und Mononucleotiden oder noch kleineren Spaltprodukten vor. Außerdem läßt sich die hydrolytische Spaltung anderer Gewebsbestandteile und deren Vermischung mit den Nucleinsäureextrakten nicht ganz vermeiden. Eine ausführliche kritische Darstellung dieser beiden Methoden und ihrer zahlreichen Modifikationen findet sich in einer Übersicht bei Hutchison und Munro (19).

Bei der Kirby-Methode werden die Proteine der Gewebe nach dem Homogenisieren mit Phenol denaturiert und die Nucleinsäuren durch Behandlung mit Detergentien oder geeigneten Salzkonzentrationen in Lösung gebracht. Nach der Trennung von Wasser- und Phenolphase enthält die erstere die Nucleinsäuren. Diese befinden sich hierbei noch in hochpolymerem Zustand und können mit 2 Vol. Äthanol gefällt werden. Eine Trennung von DNS und RNS wird im allgemeinen durch Behandlung mit spezif. Nucleasen erreicht. Auch bei diesem Verfahren kommt es zu fremden Beimengungen, für die eine Reihe weiterer Reinigungsschritte ausgearbeitet worden sind. Eine Übersicht darüber gibt Kirby (26).
Zur quantitativen Bestimmung der Nucleinsäuren dienen der Phosphat-Gehalt, die UV-Absorption der Basen und der Gehalt an Ribose und Desoxyribose; als Reinheitskriterien das Verhältnis der einzelnen Meßwerte zueinander, ausgedrückt als spezif. Extinktionskoeffizient für Nucleinsäure-Phosphat (ε_p) für die am Absorptionsmaximum abgelesene UV-Extinktion sowie als % P von der durch die Zuckerbestimmungen ermittelten Nucleinsäure-

menge. Die hierfür notwendigen Analysenverfahren sind im Abschnitt über die Methodik dargestellt.

Die UV-Absorption der Purin- und Pyrimidin-Basen wird durch Proteinbeimengungen auf Grund von deren Tyrosin-Gehalt stark beeinflußt. Bei der Schmidt-Thannhauser-Methode wird der gesamte säureunlösliche Rückstand, d.h. DNS und Protein, nach dem Entfernen der RNS in Lauge gelöst. Eine UV-Absorptionsmessung dieser Lösung ist daher unzweckmäßig, und die Bestimmung der DNS bleibt auf deren Zucker- und Phosphat-Anteil beschränkt.

1. Versuche zur Reindarstellung von Nucleinsäuren

Es wurde in dieser Arbeit eine Kombination der Methoden von Schmidt-Thannhauser und Schneider in der Weise benutzt, daß zunächst die RNS durch Behandlung mit Lauge und anschließend die DNS durch Behandlung mit heißer Säure extrahiert wurde. Im einzelnen wurde folgender Arbeitsgang durchgeführt:

1. Töten und Entbluten der Ratten durch Dekapitation
2. Rasche Entnahme von 1 g Leber, das mit dem Ultra-Turrax in 20 ml 99 %-igem Äthanol homogenisiert und anschließend 5 min bei 3000 Upm abzentrifugiert wird.
3. Extraktion der Lipoide.
   Der Rückstand, der die Nucleinsäuren enthält, wird für je 15 min unter gründlichem Umrühren nacheinander mit (jeweils 20 ml)
   1 mal 99 %-ig. Äthanol
   2 mal Äthanol/Chloroform (3/1 v/v)
   1 mal Äthanol/Äther (3/1 v/v)
   1 mal Äther
   bei Zimmertemperatur gewaschen. Die Rückstände werden durch 5 min Zentrifugieren bei 3000 Upm abgetrennt und zum Schluß an der Luft getrocknet.
4. Extraktion der niedermolekularen Komponenten mit kalter Säure.
   Das trockene Pulver wird 4 mal mit je 20 ml 0,2 n Perchlorsäure bei $0^{\circ}C$ gewaschen. Bei der ersten

Waschung wird zur besseren Benetzung des Gewebes 1 Tropfen Oktanol zugefügt. Die unlöslichen Rückstände werden jedesmal 5 min bei 3000 Upm und 0°C abzentrifugiert. Der letzte Säureüberstand enthält kein UV-absorbierendes Material mehr.

5. Extraktion der RNS mit KOH
Der nun verbliebene Rückstand läßt sich in 10 ml KOH verschiedener Konzentration fast völlig lösen. Durch einstündige Inkubation im Wasserbad bei 38°C wird der größte Teil der RNS hydrolisiert. DNS und Protein können im Extrakt mit 5 n Perchlorsäure ausgefällt werden. Dazu wird die Lösung auf einen 0,5 n Perchlorsäuregehalt gebracht. Der sich bildende Niederschlag wird mit 3000 Upm bei 0°C abzentrifugiert und wie unter 4. noch 2 mal mit je 3 ml und 1 mal mit 20 ml 0,2 n Perchlorsäure gewaschen. Die vereinigten Überstände erhielten die Bezeichnung RNS I und wurden zur Bestimmung der einzelnen Komponenten (Phosphat, UV-Absorption, Ribose, Desoxyribose) aufbewahrt.
Die KOH-Hydrolyse wird in gleicher Weise wiederholt, aber statt 1 Stunde jetzt 2 Stunden oder länger, bis zu 85 Std.. Fällen und Nachwaschen erfolgt wie beim ersten Mal. Die vereinigten Überstände sind als RNS II gekennzeichnet worden.

6. Extraktion der DNS mit Perchlorsäure
Der nach der KOH-Behandlung säureunlösliche Rückstand wird in 10 ml Perchlorsäure aufgeschwemmt und im Wasserbad inkubiert. Dabei wurden Säurekonzentrationen, Temperatur und Zeit variiert. Die Abtrennung des unlöslichen Anteils erfolgte auf der Zentrifuge bei 0°C und 3000 Upm in 15 min. Der Rückstand wird 1 mal mit 10 ml 0,2 n Perchlorsäure nachgewaschen. Die saure Hydrolyse wurde in den meisten Fällen in gleicher Weise wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden als DNS bezeichnet.

Es mußte nun zunächst geklärt werden, ob die Extraktion der RNS mit KOH vollständig gelingt und welche Bedingungen dafür am besten geeignet sind.
Fleck und Munro (10) beschäftigten sich mit dieser Frage und stellten fest, daß 1 stündige Hydrolyse bei 38°C mit 0,3 n KOH ebenso wie mit 1 n KOH geeignet ist, RNS aus einer Ribosomen-Fraktion vollständig in säurelösliche Form zu überführen. Sie stützten sich dabei auf mit der Orcin-Methode gemessene Werte, die anzeigten, daß sämtliches mit Orcin reagierendes, d.h. ribosehaltiges Material bereits im 1 Stunden-Hydrolysat enthalten ist. Die UV-Absorption erhöht sich dagegen bei längerer Inkubation, und zwar mit 1 n KOH stärker als mit 0,3 n KOH. Eine Ausdehnung der Hydrolyse über 1 Stunde hinaus hat demnach eine stärkere Verunreinigung der Fraktion zur Folge und kann bei quantitativer Bestimmung der RNS auf Grund der UV-Extinktion zu Fehlern führen. Der Phosphat-Gehalt wurde dabei nicht berücksichtigt, da keine Lipoidextraktion vorgenommen worden war. In den hier beschriebenen Versuchen wurde in jedem Falle eine Fettextraktion durchgeführt. Dabei wurde in einer Serie von Versuchen festgestellt, daß weder mit 1 n noch mit 0,3 n KOH eine vollständige Extraktion von RNS-Phosphat nach einer Stunde gelang. Eine geringe Menge Phosphat wurde jeweils noch in der sogenannten RNS II gefunden. Setzt man die Summe von RNS I und RNS II, festgestellt an der Phosphat-Menge, gleich 100 %, so ist der Anteil von RNS I stets gleich hoch und beträgt ca. 95 %. Die Verwendung von 1 n KOH liefert einen etwas höheren Anteil als die von 0,3 n KOH (Tabelle I).
Auch bei sehr langer Hydrolyse des 2. Anteils, der RNS II, änderte sich das Verhältnis nicht, d.h. der Anteil am Gesamt-RNS-Phosphat war nach 2-stündiger Inkubation in 0,3 n KOH ebenso groß wie nach 48-stündiger Inkubation in 1 n KOH.

	RNS I	$\varepsilon_{\text{RNS I-P}}$	n
0,3 n KOH	94,7 ± 1	10 500 ± 260	23
1 n KOH	96,8 ± 0,8	11 000 ± 640	10
	$p < 0,05$	$p < 0,25$	

Tab. 1

RNS - Extraktion nach 1 Stunde alkalischer Hydrolyse bei 38°C. RNS I als % von RNS I + RNS II.

n = Anzahl der untersuchten Homogenate.

Die Vermutung, daß eine teilweise Destruktion von DNS eintritt, fand in keinem der zu dieser Berechnung herangezogenen Untersuchungen eine Stütze, denn der Nachweis von Desoxyribosid mit Diphenylamin war stets negativ. In einigen Fällen, bei sehr langer Hydrolysezeit und bei Anwendung von 5 n KOH, konnte DNS in der RNS II festgestellt werden. Dann war jedoch auch der Phosphat-Anteil in dieser Fraktion deutlich erhöht.
Die Orcin-Reaktion auf RNS konnte in der RNS II - Fraktion nicht angewendet werden, weil sich ein uncharakteristischer gelber Farbstoff bildete.

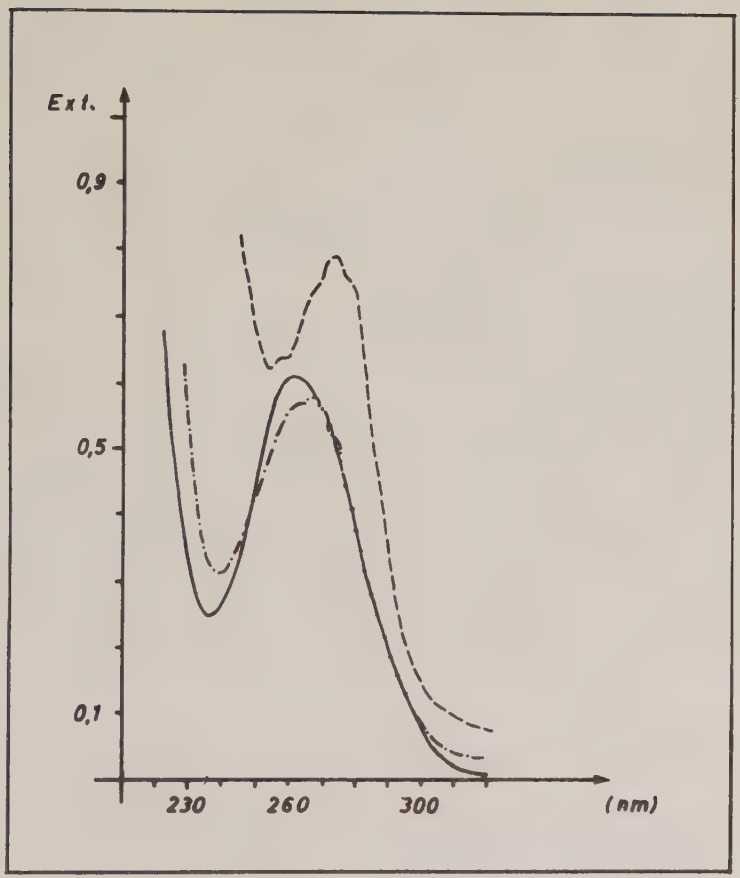


Abb. 1

UV-Absorptions-Spektren von mit KOH extrahierten RNS-Fraktionen
Die Lösungen sind verschieden stark verdünnt.

———— RNS I: 0,3 n KOH, 1 Stunde;
-·-·-·-·- RNS II: 0,3 n KOH, 2 Stunden;
– – – – – RNS II: 1 n KOH, 48 Stunden.

Anhaltspunkte für die Reinheit der RNS-Fraktionen lassen sich auch aus ihren UV-Spektren ableiten. Die Absorption in der RNS I-Fraktion weicht nicht von dem üblichen RNS-Spektrum ab. Bei länger dauernder Hydrolyse allerdings ändert sich das Spektrum, indem das Absorptionsmaximum von 260 nm, dem für Nucleinsäuren charakteristischen Maximum, zunehmend nach 275 nm, dem Absorptionsmaximum der Leberpeptide, verschoben wird. Das Nucleinsäuremaximum ist dann noch als Schulter bei 260 nm zu erkennen. (Abb. 1).
Ausdehnung der Hydrolysezeit über eine Stunde führt zur Extraktion von Substanzen, die Verunreinigungen darstellen und die keine Nucleinsäuren sind. Derartige Stoffe können auch in die RNS I gelangen. Dies geschieht bei der Anwendung einer höheren Laugenkonzentration zur Extraktion der RNS I - Fraktion. Die zusätzliche Freisetzung von UV-absorbierenden, aber phosphatfreien Bestandteilen ist dann an der Zunahme des Extinktionskoeffizienten ($\varepsilon_{\text{RNS I-P}}$) zu erkennen (Tab. 1)
Auf Grund dieser Befunde erscheint es also am zweckmäßigsten, das Gewebe zur Extraktion der RNS zunächst bei 38°C für eine Stunde mit 0,3 n KOH zu behandeln. Dabei bleibt ein kleiner Rest von ca. 5 % der RNS zurück. Dieser Rest muß entfernt werden, wenn außerdem die DNS bestimmt werden soll. Dazu ist eine nochmalige Behandlung mit 0,3 n Lauge geeignet, die dieses Mal doppelt so lange, also 2 Stunden, dauern muß. Zu der sich anschließenden Gewinnung von DNS wird heiße Perchlorsäure benutzt. Auch die DNS soll möglichst vollständig erfaßt und möglichst frei von störenden Beimengungen dargestellt werden.

Bei der Behandlung der DNS mit Perchlorsäure tritt nicht, wie bei der alkalischen Hydrolyse der RNS, eine vollständige Spaltung in einzelne Nucleotide ein, sondern es werden zuerst die Purinbasen abgetrennt, während die Hydrolyse der übrig bleibenden, sogenannten Apurinsäure

langsamer vonstatten geht (Tamm, Hodes u. Chargaff 34). Aus diesem Grunde mußten auch hier die günstigsten Bedingungen für die Hydrolyse und Extraktion ermittelt werden. Als Indikator diente der Extinktionskoeffizient bezogen auf die Phosphatkonzentration (ϵ_{DNS-P}).

Ist der Extinktionskoeffizient höher als zu erwarten, dann sind vorwiegend Basen abgespalten worden, aber keine ausreichende Hydrolyse der DNS erfolgt.
In Tabelle 2 sind die ϵ_{DNS-P}-Werte aus einer repräsentativen Versuchsreihe zusammengestellt. Daraus ergibt sich, daß bei 90°C mit 0,5 n Perchlorsäure bereits in 10 bis 30 Minuten eine ausreichende Hydrolyse eingetreten ist.

Schneider, Hogeboom u. Ross (32) extrahierten RNS und DNS ursprünglich mit 1 n Perchlorsäure 15 min bei 30°C. Hutchison, Downi u. Munro (18) untersuchten die DNS-Ausbeuten mit diesem Verfahren unter verschiedenen Bedingungen und fanden, daß die höchste Ausbeute mit zweimaliger 20 min dauernder Hydrolyse bei 70°C in 1,5 n Perchlorsäure erzielt wird. Allerdings wurden bei diesen Versuchen die DNS auf Grund ihres Desoxyribose-Gehaltes bestimmt. Desoxyribose wird jedoch bei 90°C in Säure bereits teilweise zerstört, so daß die DNS-Konzentration auf diesem Wege nicht vollständig erfaßt werden kann.
Deshalb erschien es zweckmäßiger, die DNS-Konzentration an der UV-Absorption und am Phosphat-Gehalt zu messen. Die stärkste UV-Absorption der DNS lag übrigens nach der Einwirkung heißer Perchlorsäure nicht bei 260 nm, sondern bei 265 nm. Diese Verschiebung trat auch bei hochpolymerer Lachssperma-DNS ein, die im Handel erhältlich ist, wenn sie mit heißer Säure behandelt wurde. Dieser Effekt wurde bei den Ribonucleinsäuren verschiedener Herkunft nicht beobachtet. Die UV-Extinktion der säureextrahierten DNS wurde deshalb stets bei 265 nm abgelesen.

$HClO_4$ -Konz.	°C	10 min	30 min	40 min	60 min	70 min
0,1 n	70	29 500	19 000			
	90					
0,3 n	70	26 400	15 600			
	90					
0,5 n	70	21 300	15 200			
	90	11 600	10 800	11 350		
0,7 n	70	18 700	14 000			
	90	11 700	10 600	10 900		
1,0 n	70	14 900	13 500	12 200	12 500	12 600
	90	12 400	10 700	11 200	11 400	12 500

Tab. 2

Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten ε_{DNS-P} von Dauer, Temperatur und Säurekonzentration der Hydrolyse.

	γ DNS-P pro g Leber	γ DNS-P pro g lipoidextrahierte Trockenmasse	ε DNS-P	γ RNS-P/ γ DNS-P	n
0,7 n $HClO_4$ 2 x 20 min 90°C	133±23		12 700±600	5,1±0,84	8
1,5 n $HClO_4$ 2 x 20 min 75°C	298±40	1 254±95 (n = 10)	11 900±450	3,0±0,45	27
	p < 0,0005		p < 0,0005	p<0,0005	

Tab. 3

Ausbeute an DNS-Phosphor nach Hydrolyse unter verschiedenen Bedingungen.
n = Anzahl der untersuchten Homogenate.
Es wurden Ratten von 150 - 250 g Körpergewicht verwendet. Schwankungen in den Nucleinsäure-Konzentrationen mögen hier auch mit dem Wachstum zusammenhängen.

Tabelle 3 zeigt, daß die Ausbeute an DNS-P durch 2 mal 20 min dauernde Extraktion mit 1,5 n Perchlorsäure mehr als doppelt so hoch ist (bei 75°C) wie mit 0,7 n Perchlorsäure und 90°C. Außerdem wird bei der höheren Temperatur mehr absorbierendes, aber phosphatfreies Material freigesetzt, was an dem hohen Extinktionskoeffizienten zu erkennen ist.
Somit ergibt sich, daß die DNS Extraktion am besten mit 1,5 n Perchlorsäure bei 75°C erfolgen sollte.

Die von Kirby (23) 1955 erstmals beschriebene Extraktion der Nucleinsäuren mit Phenol eignet sich gut zur Gewinnung von Nucleinsäuren im hochpolymeren Zustand. Die inzwischen eingeführten zahlreichen Modifikationen betreffen in erster Linie die Art der verwendeten Salze in der wässrigen Phase, die Art und Konzentration der Detergentien und die Temperatur. Für die eigenen Untersuchungen wurde das Verfahren benutzt, mit dem Dingman und Sporn (6) aus Zellkernen die RNS und die DNS extrahiert haben. Zur Gewinnung der RNS verwendeten sie Phenol mit 0,05 % Dodezylsulfat. Zur Gewinnung der DNS erhöhten sie die Konzentration des Dodezylsulfats auf mindestens 1 %. Der nachstehend aufgeführte Arbeitsgang lehnt sich eng daran an. Die gesamte Aufarbeitung wurde bei 0 bis 4°C durchgeführt.

1. 3-4 g Leber werden in 20 ml einer Lösung, bestehend aus 0,05 m Tris-Puffer, pH 7,5
   0,001 m EDTA-Na
   0,001 m Na-Zitrat
   mit Methanol-Trockeneis schnell eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt.
2. Nach dem Auftauen wird der Lösung 0,05% Na-Dodezylsulfat zugesetzt und die Leber in einem Glas-Teflon - Homogenisator nach Potter-Elvehjem (⟷), unter Kühlung, homogenisiert.
3. Zugabe von 20 ml Phenollösung, bestehend aus Phenol:H_2O = 10:1 g/v. Das Phenol, das in gut gereinigter Form (p.A.) und nur so lange es farblos war, verwendet wurde, enthielt 0,1 % 8-Hydroxychinolin.
4. Das Gemisch wird in einem Zentrifugenglas mit eingeschliffenem Glasstopfen 1 Stunde geschüttelt und danach 10 min bei 3000 Upm zentrifugiert. Die oberste, wässrige Phase wird abgenommen und der Rückstand noch 4 mal mit je 10 ml der Tris-Pufferlösung mit 0,05 % Na-Dodezylsulfat 15 min ausgeschüttelt und abzentrifugiert. Die vereinigten wässrigen Überstände werden

zur Weiterverarbeitung aufbewahrt und als Fraktion I gekennzeichnet. Bei versuchsweiser getrennter Aufarbeitung des letzten Überstandes enthielt dieser keine Nucleinsäuren mehr; die durch dieses Medium erreichbare Extraktion war demnach vollständig.

5. Nach Zugabe von weiteren 10 ml der Phenollösung zu dem Rückstand wird dieser 3 mal mit je 10 ml einer Tris-Puffer-Lösung ausgeschüttelt, die nun auf pH 9 gebracht wurde und 1 % Na-Dodezylsulfat enthielt. Das erste Ausschütteln dauert 1 Stunde, das zweite und dritte 15 min. Zur Trennung der Phasen wird bei 3000 Upm zentrifugiert. Die wässrigen Überstände sind stark viskos. Sie werden vorsichtig abgenommen und dann zur Fraktion II miteinander vereinigt. Zwischen Wasser und Phenol befindet sich eine schmierige Schicht unlöslichen Materials, von dem nichts mitgenommen werden darf.
6. Fraktion I und Fraktion II werden zur weiteren Reinigung mit dem halben Volumen Phenol-Lösung noch einmal ausgeschüttelt. Bei Fraktion II läßt sich der Überstand nicht restlos von der schmierigen Zwischenschicht abnehmen, da sonst die Gefahr der erneuten Verunreinigung der im Überstand befindlichen Nucleinsäuren mit Proteinen besteht.
7. Aus den wässrigen Lösungen werden die Nucleinsäuren mit 2 Vol. 99%-ig. Äthanol ausgefällt. Nach Zusatz des Alkohols bleiben die Ansätze mindestens 1 Stunde bei -20°C stehen. In Fraktion I bildet sich ein flockiges, in Fraktion II ein netzförmiges, schlieriges Sediment. Beide Niederschläge lassen sich mit 3000 Upm in 10 min abzentrifugieren. Sie werden dann in 10 ml 0,2 m Acetatpuffer, pH 5,5, aufgenommen. Zur Reinigung erfolgt noch zweimaliges Umfällen mit 2 Vol. Äthanol aus Acetatpuffer. Dabei wird gleichzeitig das Phenol entfernt.

8. Zur Trennung von RNS und DNS und zur Messung der UV-Extinktion und des Phosphat-, (Ribose-) und Desoxyribose-Gehaltes werden die Nucleinsäuren entsprechend der Schmidt-Thannhauser-Methode hydrolysiert.
Fraktion I enthielt reine RNS, d.h. nach der Hydrolyse war kein UV-absorbierendes Material mehr mit Säure fällbar.
Fraktion II enthielt RNS und DNS im Verhältnis von ungefähr 1 : 5.
Mit der Diphenylamin-Reaktion konnte sichergestellt werden, daß die RNS-Anteile frei von DNS waren.
Die spezifischen Extinktionskoeffizienten betrugen
für RNS-P ε = 10 500
für DNS-P ε = 8 900
Beim Vergleich der Ausbeuten (γ NS-P/g Leber) aus verschiedenen Lebern ergaben sich bei diesem Verfahren erhebliche Unterschiede. Kirby, Kidson und Ralph (22) fanden, daß Ribonucleasen partiell die Phenolbehandlung überstehen. Dadurch könnten Verluste vor allem beim Umfällen mit Acetatpuffer verursacht werden. Zur quantitativen Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration im Gewebe wäre folglich die kombinierte Schmidt-Thannhauser-Schneider-Methode besser geeignet. Die Phenolmethode liefert RNS, die völlig frei ist von DNS, während in der DNS noch 20% RNS enthalten sind. Dieser RNS-Anteil stammt wahrscheinlich aus den Kernen, wie sich in späteren Versuchen herausstellte.

2. Versuche mit radioaktiv markierten Vorstufen von Nucleinsäuren

Durch die Versuche sollte festgestellt werden, welche der radiomarkierten Vorstufen sich für das Studium der Geschwindigkeit des Einbaues in die Nucleinsäuren am besten eigneten. Alle 4 Stoffe waren Pyrimidinderivate. Orotsäure und Uridin sollten als Vorstufen der RNS dienen und Thymidin, das mit 2 verschiedenen Markierungen vorlag, als Vorstufe der DNS.
Die folgenden Substanzen wurden verwendet:

1. Uridin-H-3, spezif. Aktivität 3,84 C/mM
   100 µC/100 g Körpergewicht intraperitoneal
2. Orotsäure - 5 - H-3, spezif. Aktivität 2,3 C/mM
   50 µC/100 g Körpergewicht intravenös
3. Thymidin-Methyl-H-3, spezif. Aktivität 6,7 C/mM
   100 µC/100 g Körpergewicht intraperitoneal
4. Thymidin - 2 - C-14, spezif. Aktivität 130 mC/mM
   5 µC/100 g Körpergewicht intravenös.

Die behandelten Ratten wogen 150-250 g und wurden 1 Stunde nach der Applikation eines dieser Präparate getötet. Die Extraktion der Nucleinsäuren aus den Lebern erfolgte mit dem Verfahren von Schmidt-Thannhauser-Schneider (30,31) und parallel dazu mit Phenol und Dodezylsulfat, wie von Kirby (23) inauguriert und im vorhergehenden Abschnitt geschildert.
Die Ergebnisse der Versuche sind in den Abb. 2 - 5 und in den Tabellen 4 - 6 dargestellt.
Daraus geht hervor, daß die Injektion von Orotsäure - 5 - H-3 ausschließlich zur Radiomarkierung der RNS führt, Thymidin - 2 - C-14 dagegen selektiv in die DNS eingebaut wird. Mit den beiden anderen Stoffen wurden nicht so eindeutige Ergebnisse erzielt, obwohl auch sie radiochemisch einheitlich waren. Jedenfalls zeigte sich bei der papierchromatographischen Untersuchung aller Präparate in Butanol:Eisessig:H_2O = 4:1:1 mittels Autoradiographie des Teststreifens nur ein einheitlicher

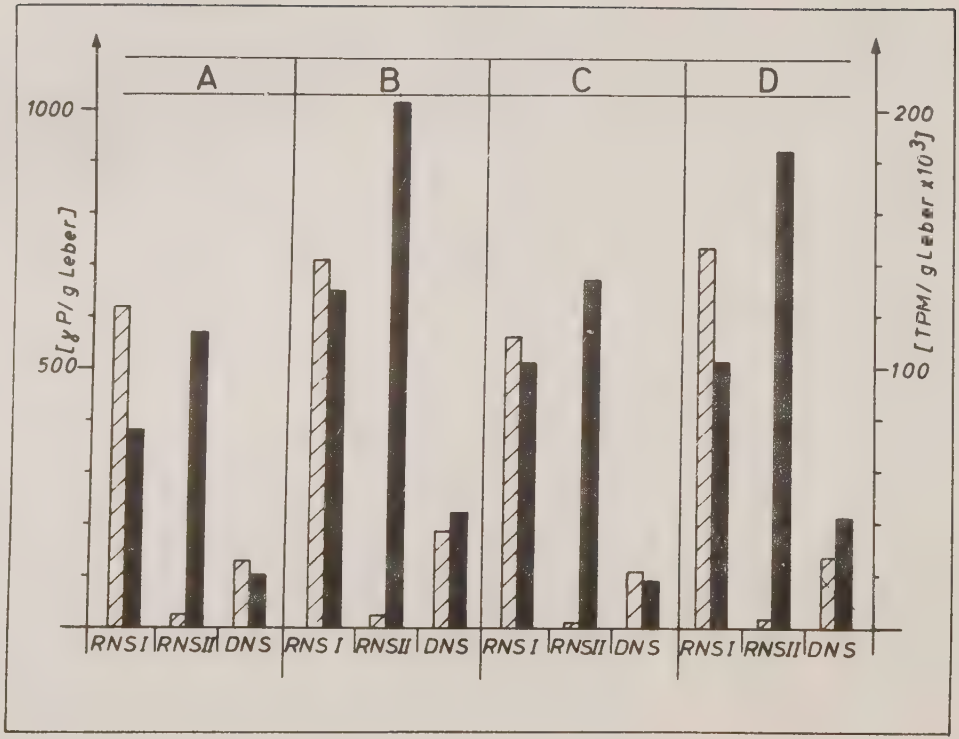


Abb. 2

TPM- und Phosphor-Gehalt von Nucleinsäurefraktionen aus Lebern mit Uridin-H-3 behandelter Ratten.

Extraktion nach Schmidt-Thannhauser-Schneider.

Die großen Buchstaben bezeichnen jeweils ein Tier.

γP TPM

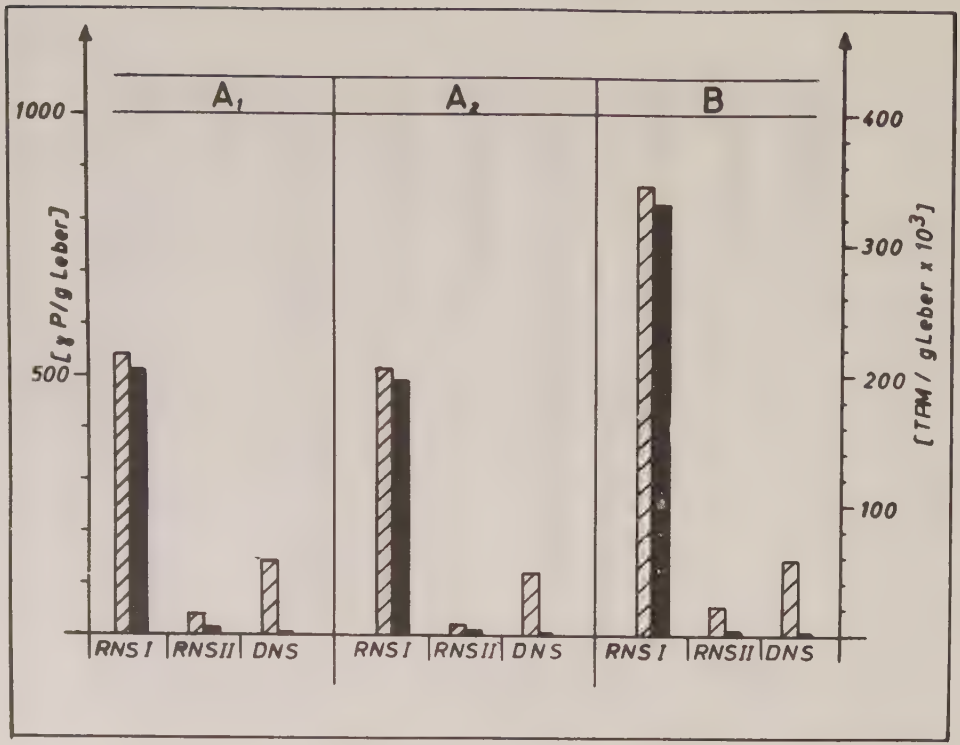


Abb. 3

TPM- und Phosphor-Gehalt von Nucleinsäurefraktionen aus Lebern mit Orotsäure - 5 - H-3 behandelter Ratten.

Extraktion nach Schmidt-Thannhauser-Schneider.

Die großen Buchstaben bezeichnen jeweils ein Tier.

A_1 = 0,3 n KOH

A_2 = 0,1 n KOH

γ P TPM

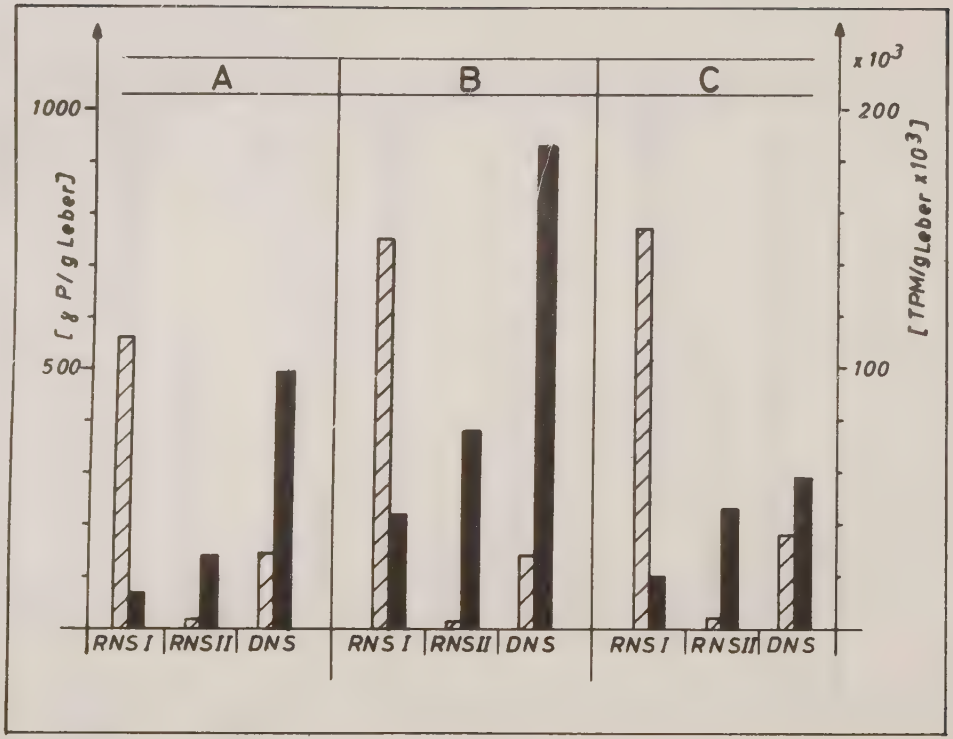


Abb. 4

TPM- und Phosphor-Gehalt von Nucleinsäurefraktionen aus Lebern mit Thymidin-Methyl-H-3 behandelter Ratten.

Extraktion nach Schmidt-Thannhauser-Schneider.

Die großen Buchstaben bezeichnen jeweils ein Tier

γ P TPM

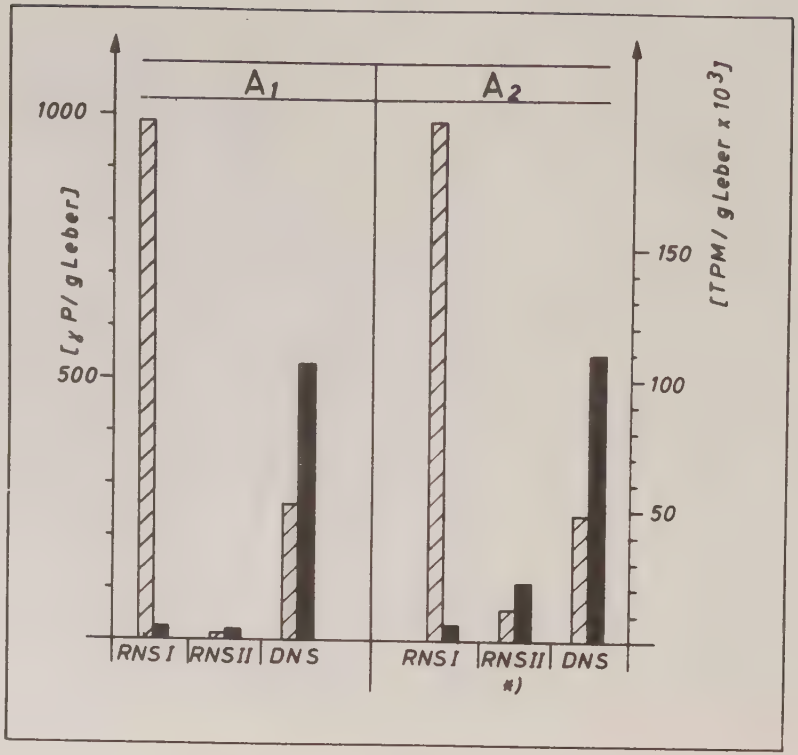


Abb. 5

TPM- und Phosphor-Gehalt von Nucleinsäure-Fraktionen aus Lebern mit Thymidin - 2 - C-14 behandelter Ratten.

Extraktion nach Schmidt-Thannhauser-Schneider.

Die großen Buchstaben bezeichnen jeweils ein Tier.

A_1 = RNS II 2 Stunden hydrolysiert.

A_2 = RNS II 20 Stunden hydrolysiert.

γ P TPM

*) In dieser Fraktion wurde mit der Diphenyl-Reaktion DNS festgestellt.

		RNS I	RNS II	DNS
I	A	140	12 450	291
	B	179	10 800	176
	C	103	4 400	160
II	A	11	52	36
	B	26	95	26
	C	24	96	9

Tab. 4 Uridin - H-3

	RNS I	RNS II	DNS
I	275	100	1
II	82	1 920	1

Tab. 5 Orotsäure - 5 - H-3

		RNS I	RNS II	DNS
I	A	26	2 090	516
	B	57	4 680	1 330
	C	15	625	371
	D	25	600	120
II	A	4	12	591
	B	10	43	1 280
	C	9	68	270
	D	2	44	61

Tab. 6 Thymidin - Methyl - H-3

Tab. 4 - 6 Spezif. Aktivitäten von Nucleinsäurefraktionen 1 h nach Applikation der verschiedenen markierten Vorstufen. I Extraktion nach Schmidt-Thannhauser-Schneider. II Extr. mit Phenol. Die gr. Buchstaben bezeichnen jeweils Homogenate aus der gleichen Leber. Die beiden RNS - Fraktionen ergeben sich aus der Reihenfolge, in der sie bei der Extraktion gewonnen werden. Diejenigen von I sind nicht identisch mit denen von II.

radiomarkierter Substanzfleck und damit kein Anhaltspunkt für gröbere radioaktive Verunreinigungen der Präparate. Der relativ hohe Gehalt an Radioaktivität in der RNS II nach Applikation von Uridin-H-3 oder Thymidin-Methyl-H-3 (Abb. 2 und 4) müßte also dadurch bedingt sein, daß die radioaktiven Anteile der verabfolgten Substanzen im Körper in Produkte übergehen, die in andere Gewebskomponenten eingebaut werden, die nicht zu den Nucleinsäuren gehören. Bei der Phenolmethode stören solche Komponenten weniger als bei der Extraktion mit Äther (Tab. 4 und 6). Nach der Anwendung von Uridin-H-3 sind die spezifischen Aktivitäten der Nucleinsäuren bei der Aufarbeitung mit der Phenolmethode über-haupt sehr niedrig (Tab. 4), und die Markierungen von RNS und DNS sind nicht sehr verschieden. Da Uridin ein charakteristischer RNS-Baustein ist, der in der DNS nicht vorkommt, wäre jedoch ein bevorzugter Einbau von Uridin-H-3 in die RNS zu erwarten. Folglich muß das Uridin-H-3 schon bevor es zur RNS-Synthese verwendet wird, zum großen Teil chemisch umgesetzt und dann in fast gleicher Weise wie in die RNS auch in die DNS eingebaut werden oder zur Markierung von Stoffen beitragen, die als Verunreinigungen bei den Nucleinsäurefraktionen in Frage kommen. Das verwendete Uridin-H-3 war nicht an einer definierten Stelle des Moleküls markiert, sondern in allen Positionen, in denen der Wasserstoff nicht leicht austauschbar ist, kann er durch Tritium ersetzt sein. Offenbar hat diese Art der Markierung eine solche Fülle von markierten Stoffwechselprodukten zur Folge, daß eine gezielte Markierung der Nucleinsäuren nicht möglich ist.

Orotsäure dagegen ist die gemeinsame Vorstufe aller Pyrimidinderivate, die in Nucleinsäuren vorkommen. Hurlbert und Potter (17) untersuchten den Einbau von Orotsäure - 6 - C-14 in die Rattenleber und fanden nach 20 Stunden in der RNS eine ungefähr 60 mal höhere

Radioaktivität als in der DNS. Dieser Einbau verläuft anfänglich über die Bildung von Uridin-Nucleotiden. Erst nach längerer Inkorporationszeit (12 bis 20 Stunden) sind die Cytidin-Nucleotide etwa genauso stark markiert wie die Uridin-Nucleotide. Dagegen verläuft der Einbau in die DNS nach Bildung von Desoxy-Cytidin- und Thymidin-Nucleotiden offenbar entweder sehr langsam oder über einen Nebenweg. Bei der Verwendung von Orotsäure - 5 - H-3, deren Markierung also einzig auf dem Tritiumatom am Kohlenstoffatom 5 beruht, kann kein markiertes thyminhaltiges Nucleotid entstehen, weil die Einführung der Methylgruppe mit dem Verlust des Radionuclids verbunden ist. Diese Überlegungen werden durch die Versuchsergebnisse bestätigt.

Thymidin ist ein für DNS charakteristischer Baustein, denn es ist in den Ribonucleinsäuren nicht enthalten. Die ausschließliche Markierung an der Methylgruppe schränkt die Zahl der möglichen markierten Stoffwechselprodukte von vornherein ein. Auf der Stufe des Thymidin kann die Methylgruppe wahrscheinlich nicht abgespalten werden. Dem muß also die Hydrolyse des Nucleosids vorangehen.
Thymidin kann durch eine Nucleosid-Phosphorylase in Thymin und Desoxyribosylphosphat gespalten werden. Fink, Cline, Henderson und Fink untersuchten den Stoffwechsel von Thymin-Methyl-C-14 in vitro und fanden Radioaktivität in mehreren Metaboliten, von denen vor allem Glucose und Alanin für den Einbau in andere Gewebsstrukturen in Frage kommen (9).
Nach den vorliegenden Befunden (Abb. 3 und Tabelle 6) ist Thymidin-Methyl-H-3 eine brauchbare Vorstufe für die DNS, aus deren Einbau auf den Umsatz geschlossen werden kann, sofern auf eine gleichzeitige Untersuchung des RNS-Umsatzes verzichtet wird. Soll diese erfolgen, so können, speziell bei Aufarbeitung der Gewebe mit der Schmidt-Thannhauser-Methode, die mit

der RNS extrahierten, markierten Substanzen die Meßergebnisse beeinflussen. Auch bei Messungen des Einbaues in die DNS machen sich offenbar bei niedrigen spezifischen Aktivitäten solche unspezifischen Markierungen bei Anwendung der Schneider-Methode bemerkbar (Tab. 6).

Die Vorteile des Thymidins, das in Stellung 2 radioaktiven Kohlenstoff-14 enthält, gegenüber Thymidin-Methyl-H-3 liegen wohl in dem anders gearteten Stoffwechselweg dieses Kohlenstoffatoms. Canellakis (*3*) fand 1 Stunde nach der Inkubation von Thymin - 2 - C-14 mit Rattenleberhomogenat 98 % des Radionuklids in Form von $^{14}CO_2$ wieder. Der nicht als Thymidin in die DNS eingebaute C-14 geht also in ein Endprodukt über, das den Körper schnell verläßt und kann nicht in wesentlichem Umfang zur Radiomarkierung anderer Gewebsbestandteile führen. Dadurch eignet sich Thymidin - 2 - C-14 , wie die Ergebnisse bestätigen, viel besser für die Untersuchung des DNS-Umsatzes als Thymidin, das in der Methylgruppe die Radiomarkierung trägt.

Bei der Extraktion der RNS mit der Phenol-Methode nach Orotsäure - 5 - H-3 - Applikation fanden sich große Unterschiede in der spezifischen Aktivität der beiden getrennt gewonnenen RNS-Fraktionen (Tab. 7). Die zweite RNS-Fraktion, die etwa 1/10 der gesamten RNS ausmacht und sich stets gemeinsam mit der DNS herauslöste, war wesentlich höher markiert als die erste RNS-Fraktion, die in größeren Mengen vorliegt. Deshalb war zu prüfen, ob es sich um zwei Fraktionen handelt, die sich durch die Geschwindigkeit ihres Umsatzes und außerdem durch ihre verschiedene Lokalisation in der Zelle unterscheiden. Die Vermutung, daß es sich bei der kleineren hochmarkierten Fraktion um Kern-RNS handeln könnte, lag nahe, weil derartige, schnellmarkierte RNS-Fraktionen wiederholt beschrieben und vor allem aus Zellkernen isoliert wurden. **(12,14,22)**

		Cytoplasm. RNS	Kern-RNS	Gesamt-RNS
I	A	105	1140	248
	B	107	1585	274
	C	123	1365	245
	D	166	2160	368
		RNS I	RNS II	
II	A	98	1385	
	B	63	1520	
	C	80	1545	
	D	84	2380	
	D_{Kerne}	487	2345	
	$D_{Cytopl.}$	78	-	

Tab. 7

Spezif. Aktivitäten (TPM/µP) von RNS-Fraktionen nach 1 Stunde Inkorporation von 50 µC/100 g Körpergewicht Orotsäure - 5 - H-3.
Die großen Buchstaben bezeichnen Homogenate aus gleichen Lebern.

I Extraktion nach Schmidt-Thannhauser-Schneider
II Extraktion mit Phenol.

Durch Fraktionierung des Gewebes in Zellkerne und Cytoplasma und Aufarbeitung der Zellfraktionen und des Gesamthomogentes aus der gleichen Leber nebeneinander mit den verschiedenen Extraktionsverfahren konnte auf Grund der spezif. Aktivität nachgewiesen werden, daß diese hochmarkierte Fraktion Kern-RNS ist. (Tab.7). Es ist mit den angewandten Methoden nicht zu klären, ob diese Kern-RNS eine einzige homogene

Fraktion darstellt. Jedoch unterscheidet sie sich von den anderen RNS-Fraktionen deutlich, weil die spezif. Aktivität nach einer Stunde mindestens 5 bis 10 mal höher ist, weil sie im Kern vorkommt und weil sie sich bei der Extraktion mit Phenol und Dodezylsulfat so verhält wie DNS.

In Abb. 6 sind die spezif. Aktivitäten der beiden RNS-Fraktionen in Abhängigkeit von der Inkorporationszeit dargestellt worden. Mit diesem Versuch sollte festgestellt werden, welches die günstigste Inkorporationszeit ist, d.h. welche Zeit zwischen der Applikation des Precursors und der Tötung der Tiere für die Bestimmung des Umsatzes der Nucleinsäuren am besten geeignet ist.
Die Zunahme der spezif. Radioaktivität erfolgt in der Kern-RNS wesentlich schneller als in der cytoplasmatischen Fraktion. In beiden Fraktionen weisen die Kurvenverläufe anfangs eine größere Steilheit auf als im weiteren Verlauf. Bei der Kern-RNS erfolgt die Steilheitsänderung sogar mit einem scharfen Knick, während sie sich bei der Cytoplasma-RNS allmählich vollzieht. Nach dieser Änderung der Steilheit nehmen beide Kurven einen geradlinigen Verlauf an, d.h. die Markierung nimmt in der Zeiteinheit um einen konstanten Betrag zu. Bei gleichbleibender Synthesegeschwindigkeit ist die Voraussetzung dafür eine unveränderte spezif. Aktivität der Vorstufen während der gesamten Beobachtungszeit. Die Kurve, in der die Änderung der Radioaktivität in den säurelöslichen Bestandteilen der Leber gegen die Zeit aufgetragen ist, zeigt tatsächlich nach dem anfänglichen Abfall gleichbleibende Werte. Es könnte also sein, daß die geforderte Voraussetzung gegeben ist. Dazu müßte man allerdings wissen, in welcher Verbindung die Radioaktivität im Vorstufenpool enthalten ist. Darüber liegen noch keine Analysen vor. Die größere Steilheit des Anstiegs in der Kern-RNS während der zweiten Einbauphase beruht

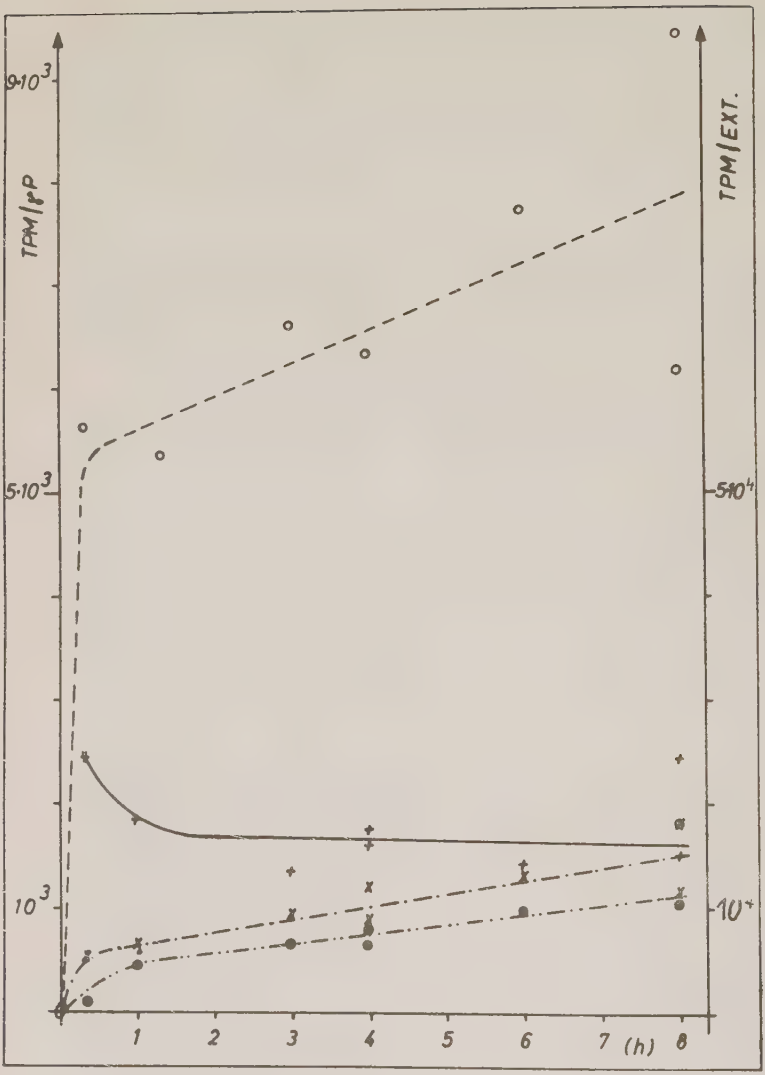


Abb. 6 Spezif. Aktivitäten der RNS - Fraktionen und der säurelöslichen Fraktion nach verschiedenen Inkorporationszeiten von Orotsäure - 5 - H-3.

o - - - - - - - o Kern - RNS x - · - · - · - x Gesamt - RNS • - · · - · · - · - • Cytopl. RNS	+ ——— + säurelösl. Fraktion
linke Ordinate	rechte Ordinate

zum Teil sicher darauf, daß diese Fraktion wesentlich kleiner ist als die des Cytoplasmas. Als zusätzlicher Faktor käme in Frage, daß die angebotene Vorstufe sich im Kern besser und schneller anreichert als im Cytoplasma. Diese Erklärungen reichen aber nicht zur Deutung des in den ersten Minuten erfolgenden steilen Anstiegs der Markierung in der Kern-RNS. Die Abflachung der Markierungsquote bei der RNS des Cytoplasmas verläuft in zeitlicher Übereinstimmung mit der Verminderung der Radioaktivität in den niedermolekularen, säurelöslichen Verbindungen und könnte auch dadurch bedingt sein; denn die Geschwindigkeit, mit der die Markierung eintritt, hängt direkt von der spezif. Aktivität der Vorstufen ab. Bei der Kern-RNS muß noch ein weiterer Faktor für die hohe Markierungsrate verantwortlich sein. Anders ist der scharfe Knick in der Kurve nicht zu erklären. Entweder wird aus einer für die Synthese sehr gut zugänglichen Vorstufe sehr rasch durch chemische Umsetzung eine, die weniger gut zugänglich ist, oder im Kern läuft die Bildung einer gesonderten RNS-Fraktion mit sehr viel höherer Geschwindigkeit ab, so daß schon nach einigen Minuten die höchste Markierung erreicht wird, die bei der im Anfang vorliegenden höheren Konzentration markierter Vorstufen eintreten kann. Die Meßdaten gestatten keine Unterscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten.

Auf der anderen Seite ergeben die Resultate jedoch keine Stütze für die Annahme, die schon häufiger diskutiert wurde, daß die RNS des Cytoplasmas im Kern gebildet wird, d.h. sich aus der Kern-RNS regeneriert. Wäre das der Fall, dann müßte unter Berücksichtigung der erheblichen Unterschiede in den absoluten Mengen der Abstand zwischen den spezifischen Aktivitäten noch weit größer sein, oder die spezif. Aktivität der Kern-RNS müßte rascher wieder absinken, statt, mit noch größerer Steilheit als die cytoplasmatische RNS, weiter anzusteigen.

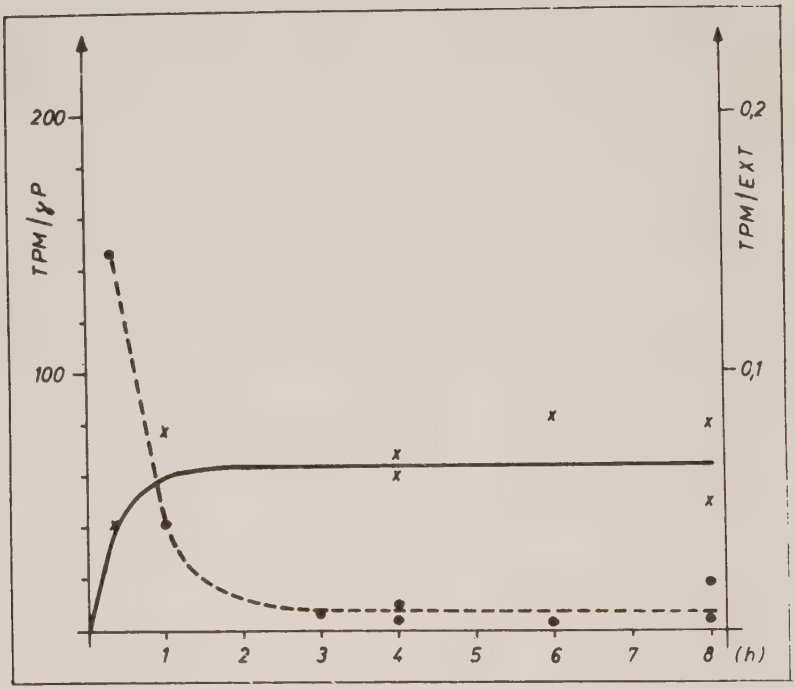


Abb. 7

Spezif. Aktivitäten der DNS - Fraktion und der säurelöslichen Fraktion nacn verschiedenen Inkorporationszeiten von Thymidin 2 - C-14.

●---------● säurelösliche Fraktion (rechte Ordinate)

x——————x DNS (linke Ordinate)

Für weitere Versuche wurde eine Stunde als Inkorporationszeit gewählt. Für die Feststellung von Änderungen in der Kern-RNS wäre ein viel kürzerer Zeitabschnitt sicher zweckmäßiger, aber es müßte auch mit erheblich größeren Streuungen gerechnet werden.

Die zeitliche Abhängigkeit der DNS-Markierung durch injiziertes Thymidin - 2 - C-14 zeigt Abb. 7. Die Kurve steigt in der ersten Stunde ziemlich steil an und bildet dann ein Plateau. Dagegen fällt die Kurve der Radioaktivität in den säurelöslichen UV-absorbierenden Gewebsbestandteilen in den ersten Stunden steil ab und erreicht damit sehr niedrige Werte, die sich dann über mehrere Stunden nicht mehr wesentlich verändern. Die Vorstufe verschwindet also sehr rasch und damit ist auch die Zeit, in der eine Markierung der DNS eintreten kann, entsprechend limitiert. Da in der Leber nur wenig Mitosen stattfinden, fällt die spezif. Aktivität nur langsam ab.

Bei gleichzeitiger Applikation von Orotsäure - 5 - H-3 und Thymidin - 2 - C-14 kann somit der Stoffwechsel von RNS und DNS gleichzeitig an einem Tier untersucht werden. H-3 und C-14 können infolge der verschiedenen Energie der bei ihrem Zerfall freiwerdenden Elektronen meßtechnisch in der gleichen Probe unterschieden und damit getrennt gemessen werden.

3. <u>Untersuchungen über den Einfluß des Nahrungsentzuges auf den Einbau von Orotsäure-5 - H-3 in die RNS.</u>

Nahrungsentzug erhöht die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase in der Rattenleber (21). Wenn der Vorgang der Enzym-Synthese unter der Beteiligung der Ribonucleinsäuren zustande kommt, ist eine Umsatzsteigerung der RNS durch Nahrungsentzug zu erwarten. Bei vielen Experimenten wird den Tieren am Abend vor dem Versuchstage das Futter entzogen; damit können die Versuchsbedingungen bezüglich der Verdauung am einfachsten auf

	Gesamt RNS	Cyto-plasm.	Kerne	Säurel. Frakt. TPM $\cdot 10^3$ / UV-Ext.	‰DNS-P / g Leber	RNS / DNS
12 h ohne Futter	1 740	1 040	7 950	81	280	2,78
	1 570	850	8 420	88	243	3,11
	3 200	2 130	10 300	141	258	2,84
	2 480	1 280	12 100	114	314	2,61
Kontrolle	1 330	905	4 660	82	233	3,33
	820	440	5 500	56	209	3,60
	1 540	703	4 030	93	218	3,22
	1 990	584	7 750	115	240	3,60

Tab. 8 Orotsäure - 5 - H-3-Inkorporation in die RNS von Leberzellfraktionen nach 12 h Nahrungsentzug, ausgedrückt in TPM/‰ RNS-P. Daneben DNS-Konzentration und Verhältnis von RNS/DNS.

	Gesamt RNS	Cyto-plasm.	Kerne	‰DNS-P / g Leber	RNS / DNS	n
12 h ohne Futter	21,3 ±2,1	12,2 ±2,3	93 ±14	274 ±33	2,83 ±0,23	4
	(123 ±10)	(155 ±19)	(141 ±15)	(122 ±12)	(82 ±8)	
Kontrolle	17,0 ±1,3	7,9 ±2,4	66 ±23	225 ±14	3,44 ±0,19	4
	p<0,01	p<0,025	p<0,025		p<0,005	

Tab. 9 Mittelwerte aus Tab. 8. Inkorporationsrate ist ausgedrückt als $\frac{\text{TPM/‰ RNS-P}}{\text{TPM/UV-Ext.}_{260\ nm}} \left[\frac{\text{spez.Akt.RNS}}{\text{spez.Akt. säurel.Frakt.}}\right]$

() % von Kontrollen

= relative spezif. Aktivität

einen einheitlichen Status gebracht werden. Für die Isolierung der Nucleinsäuren ist eine vorhergehende Fastenperiode außerdem deshalb günstig, weil der Gehalt an Glykogen in den Zellen dadurch herabgesetzt wird und das Glykogen, wenn es in großen Mengen vorliegt, eine gewisse Erschwerung der Extraktion und der Analyse hervorruft. Deshalb wurde zunächst geprüft, welchen Einfluß eine zwölfstündige Futterkarenz auf den Einbau der Radioaktivität der Orotsäure in die RNS ausübt. Zwei Gruppen von je vier Ratten, von denen der einen Gruppe zwölf Stunden vor dem Töten das Futter entzogen wurde, erhielten eine Stunde vor der Tötung 50 µC/100 g Körpergewicht Orotsäure - 5 - H-3 intravenös. Die Lebern wurden in folgender Weise aufgearbeitet: je 1 g Leber wurde zur Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der säurelöslichen Fraktion und der Gesamt-RNS verwandt. Weitere 2 g Leber dienten zur Fraktionierung in Cytoplasma und Zellkerne. Auch darin wurden die spezifischen Aktivitäten der RNS bestimmt. Die Dauer der Hydrolysen betrug 1 Stunde bei 37°C in 0,3 n KOH. In Tabelle 8 sind die spezif. Aktivitäten, ausgedrückt in TPM/γ P für die RNS und TPM/Extinktionseinheit für die säurelösliche Fraktion, zusammengestellt. Die Werte streuen innerhalb der Gruppen ganz erheblich. Die Streuung wird jedoch wesentlich geringer, wenn die spezif. Aktivitäten durch die spezif. Aktivitäten der säurelöslichen Fraktion dividiert und damit auf eine Größe bezogen werden, die von Tier zu Tier variieren kann und die Radiomarkierung der RNS wesentlich beeinflußt.

Tabelle 9 gibt die Mittelwerte der Quotienten aus Tabelle 8 wieder und darunter den Grad der Wahrscheinlichkeit, mit der die Differenzen als zufällig zu betrachten sind. Der Entzug des Futters für 12 Stunden hat also zur Erhöhung der DNS-Konzentration geführt, wogegen der RNS-Gehalt nicht gesteigert ist, aber die Radiomarkierung beider RNS-Fraktionen ist größer als bei den Kontrollen. Die Deutung dieser Befunde muß von der

erhöhten DNS-Konzentration ausgehen, die anzeigt, daß entweder Wasser abgegeben oder organisches Material eingeschmolzen wurde. Da keine Bestimmungen des Trockengewichts, des Glykogengehalts, des Fettes oder der Eiweiße erfolgte, kann keine genaue Aussage gemacht werden. Die RNS-Konzentration ist nicht angestiegen, so daß auf eine relative Verminderung geschlossen werden muß. Das kann verschiedene Gründe haben, über die nur Vermutungen angestellt werden können. In Frage kommt ein erhöhter Abbau oder eine verminderte Synthese als Folge einer verminderten Drüsentätigkeit (Produktion von Gallensaft), einer verminderten Aufnahme und Verarbeitung von resorbierten Verdauungsprodukten, einer Kohlenhydratverarmung der Zelle oder als Folge einer hormonal gesteuerten Reaktion. Die höhere spezif. Aktivität spricht eher für einen beschleunigten Abbau der RNS bei gleichbleibender Synthese.

4. Untersuchungen über den Einfluß der Adrenalektomie und des Glucocorticoids Prednisolon auf die Incorporation von Orotsäure - 5 - H-3 und Thymidin - 2 - C-14 in die Nucleinsäuren der Rattenleber.

Nahrungsentzug wirkt sich auf das Nebennierenrinden-Hypophysen-System so aus, wie eine unspezifische Schädigung. Dadurch kommt es zur Ausschüttung von ACTH und infolgedessen zur gesteigerten Produktion und Abgabe von Glucocorticoiden. Folglich können die während der Futterkarenz auftretenden biochemischen Veränderungen, dazu gehören auch die im vorangehenden Absatz beschriebenen, durch die Ausschüttung von Glucocorticoiden bedingt sein. Aus diesem Grunde wurde der RNS-Umsatz von verschiedenen Gruppen von adrenalektomierten Ratten untersucht, von denen einige einmalig Prednisolon bekommen hatten. Die verwendeten Dosen betrugen 2 und 5 mg pro kg i.v. Mit anderen radioaktiv markierten Vorstufen, nämlich mit P-32 und mit C-14 - Glycin liegen solche Untersuchungen von Feigelson, Gross und Feigelson (7) vor. Sie fanden vier Stunden nach der Gabe von 5 mg/kg

	Intakte Tiere	Adrenalektomierte Tiere							
		unbehandelt	4 h nach 5 mg Pr.	unbehandelt	4 h nach 2 mg Pr.	unbehandelt	2 h nach 2 mg Pr.	unbehandelt	2 h nach 2 mg Pr.
Rel.spez. Akt. ges.RNS	17,0 ±1,3	22,2 ±2,2	24,6 ±1,0	23,0 ±3,9	23,0 ±2,4	28,5 ±3,1	28,1 ±1,8	44,5 ±5,2	42,5 ±4,2
Rel.spez.Akt. cytopl. RNS	7,9 ±2,4	8,2 ±3,3	10,6 ±2,1	6,9 ±2,9	10,5 ±3,1	9,8 ±3	12,2 ±1,2	18,2 ±6,7	14,2 ±2,2
Rel.spez.Akt Kern-RNS	66,0 ±23	----	----	103 ±29	117 ±22	----	----	249 ±29	226 ±12
µC Orots-5-H^3 pro 100g K.G.	50	5o	50	25	25	25	25	10	10
Spez. Akt. DNS	-----	47,0 ±7,0	26,0 ±11	53,0 ±3,0	33,0 ±18	48,0 ±10	76,0 ±19	57,0 ±14	44,0 ±10
µC Thymidin 2-C-14/100gKG	-----	5	5	5	5	5	5	5	5
γ DNS-P pro g Leber	-----	303 ±37	271 ±36	251 ±24	229 ±20	225 ±20	228 ±41	270 ±14	250 ±38
RNS-P / DNS-P	3,44 ±0,19	2,74 ±0,39	3,0 ±0,41	3,37 ±0,32	3,55 ±0,23	3,48 ±0,26	3,31 ±0,3	3,03 ±0,22	3,28 ±0,41
TPO-Akt.*	-----	1,41 ±o,52	15,5 ±2,42	1,41 ±0,52	9,1 ±2,24	1,41 ±0,52	6,21 ±1,45	1,41 ±0,52	6,21 ±1,45
n	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Tab. 10 Orotsäure - 5 -H-3 und Thymidin - 2 - C-14 - Einbau in RNS und DNS, DNS-Konzentrationen und RNS/DNS - Verhältnis in Lebern adrenalektomierter Ratten. die teilweise mit Prednisolon (Pr.) behandelt sind. Prednisolondosis pro kg Körpergewicht.

* Tryptophanpyrrolase-Aktivität in µM/g/h.

Cortison einen erhöhten Einbau in die RNS der Rattenleber. In den eigenen Versuchen (Tab. 10) zeigte sich zunächst eine Abnahme der RNS im Verhältnis zur DNS. Der nach Adrenalektomie erhaltene Quotient RNS:DNS wird kleiner. Bei drei von vier Versuchen mit Prednisolon ist wenigstens in der Tendenz eine Rückkehr zu den Normalwerten zu erkennen. Einer statistischen Analyse sind die Zahlen wegen der verhältnismäßig großen Streuungen bei relativ geringer Tierzahl nicht zugänglich. Eindeutige Rückschlüsse auf Veränderungen der RNS-Synthese erlauben die Meßresultate nicht. Lediglich bei den beiden Tiergruppen, die vier Stunden nach der Prednisoloninjektion getötet wurden, ist eine erheblich höhere spezif. Aktivität in der cytoplasmatischen RNS vorhanden. Die DNS wurde in drei von vier Versuchsgruppen nach Prednisolon deutlich weniger markiert. Das läßt sich auf die Mitosehemmende Wirkung der Glucocorticoide zurückführen. Jedenfalls verlaufen die Änderungen der Synthese von RNS und von DNS gegensinnig und nicht gleichsinnig. Als Nebenbefund ergab sich ein verhältnismäßig stärkerer Einbau bei verminderter Orotsäure-Dosis, die von 50 µC/100 g Körpergewicht über 25 auf 10 µC herabgesetzt wurde. Der Quotient

$$\frac{\text{spezif. Aktivität RNS}}{\text{spezif. Aktivität säurel. Frakt.}}$$

stieg mit Verringerung der Dosis in allen Fraktionen an. Aus diesem Grunde dürfen nur die Ergebnisse von Versuchsgruppen mit gleicher Dosierung untereinander verglichen werden.

Die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase war in allen Versuchen mit Prednisolon erheblich gesteigert (Tab. 10). Daraus geht hervor, daß die Prednisolondosen und die Zeitabstände vor der Tötung so gewählt waren, daß die biochemischen Effekte deutlich nachweisbar sind.

Besprechung der Ergebnisse

Die im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit dem Ziel durchgeführt, ein brauchbares Verfahren auszuarbeiten, mit dem die Konzentration der RNS und der DNS in der Leber ermittelt werden kann. Gleichzeitig sollte die Umsatzgeschwindigkeit der beiden Nucleinsäurearten quantitativ erfaßt werden, indem nach der Gabe von radioaktiv markierten Vorstufen die spezif. Aktivität bestimmt werden sollte. Jedes der beiden näher geprüften Verfahren hatte sich bei der Anwendung mit anderen Geweben oder Organen bereits als brauchbar erwiesen. Lebergewebe jedoch erfordert ein in manchen Punkten abgewandeltes Vorgehen, damit keine die Analyse störenden Verunreinigungen in die Extrakte gelangen. Bei der Anwendung von wasserhaltigem Phenol, die von Kirby (23) eingeführt wurde, ließen sich die Konzentrationen von Dodezylsulfat und die am besten geeigneten pH-Werte ermitteln, mit denen die RNS getrennt von der DNS extrahiert werden konnte. Die Fraktionen sind weitgehend frei von Begleitstoffen, und durch Bestimmung von Phosphat, der Extinktion bei 260 nm und des Zuckeranteiles mit Orcin oder mit Diphenylamin läßt sich die Konzentration der jeweiligen Nucleinsäuren feststellen. Die Durchführung dieses Verfahrens ist jedoch ziemlich langwierig. Außerdem erwies es sich für die Erfassung der gesamten RNS-Mengen weniger geeignet als die Methode von Schmidt-Thannhauser (30). Bei der Bestimmung der spezif. Radioaktivität dagegen ergab die Extraktion mit Phenol gut reproduzierbare Werte. Außerdem zeigte sich hierbei, daß eine bestimmte RNS-Fraktion, deren Menge etwa 1/5 bis 1/10 der Gesamt-RNS ausmacht, erst bei der Dodezylsulfat-Konzentration und dem pH-Wert zu extrahieren ist, die für die Herauslösung der DNS erforderlich sind. Dieser Befund ergab den Hinweis darauf, daß es sich dabei um eine im Kern lokalisierte RNS-Fraktion handeln könnte. Das hat sich dann bei der Extraktion der Nucleinsäuren nach der Zellfraktionierung in Kerne und Cytoplasma

bestätigt. Später stellte sich heraus, daß dieser Anteil der RNS nach der Verabfolgung von markierten Vorstufen eine wesentlich höhere spezif. Aktivität aufweist. Durch die Auftrennung des Leberhomogenates in Kern und Cytoplasma war es dann auch mit Hilfe der Schmidt-Thannhauser-Methode möglich, die beiden RNS-Fraktionen zu separieren. So erwies sich die Extraktion der RNS mit Lauge nach Schmidt-Thannhauser und der DNS mit Perchlorsäure nach Schneider (31) im Anschluß an die Zellfraktionierung als das vorteilhafteste Verfahren für die weiteren Untersuchungen. Obwohl die Methode von Kirby zu sehr sauberen Extrakten führt, wird sich der erheblich größere Aufwand nur dann lohnen, wenn man die Nucleinsäuren im nativen, hochpolymeren Zustand gewinnen will. Für die Probleme, die zunächst untersucht werden sollten, war das nicht erforderlich, so daß das einfache Verfahren bevorzugt wurde. Die Extraktion mit 0,3 n Säure bei 37°C ergab in einer Stunde ca. 95% der Gesamt-RNS. Um auch den Rest noch vor der DNS-Extraktion herauszulösen, mußte eine zweite alkalische Hydrolyse angeschlossen werden. Das ist, wie Fleck und Munro (10) fanden, bei der Aufarbeitung von Leber-Mikrosomen nicht notwendig, weil dabei schon die erste Extraktion vollständig ist. Auch war die Orcinmethode, die Fleck und Munro zur quantitativen Bestimmung der RNS herangezogen haben, in den eigenen Untersuchungen nicht ausreichend zuverlässig, sondern es kam wahrscheinlich durch Beimengungen von Glykogen und anderen reduzierenden Gewebsbestandteilen häufig zu uncharakteristischen Verfärbungen. Aus diesem Grunde dienten die Phosphat-Bestimmung und die Ermittlung der Extinktion bei 260 nm für die Messung der Konzentration. Da sich herausstellte, daß Phosphat und die bei 260 nm absorbierenden Bestandteile in recht konstanter Relation in den Extrakten vorhanden waren, wurde später nur noch die Extinktion gemessen.

Bei der anschließenden Gewinnung der DNS hat es sich bewährt, bei 75°C mit 1,5 n Perchlorsäure zu extrahieren, so, wie von Hutchison, Downie und Munro (18) vorgeschlagen wurde. Die ursprünglich von Schneider empfohlene Extraktion bei 90°C mit 1 n Perchlorsäure ergibt eine geringere Ausbeute.

Für die sich daran anschließenden Untersuchungen mit radioaktiven Vorstufen war es erforderlich, diejenigen herauszufinden, die für die selektive Radiomarkierung von RNS und DNS in einem Tier am besten geeignet sind. Uridin-H-3, das völlig durchmarkiert war, hat gegenüber Orotsäure - 5 - H-3 verschiedene Nachteile. Erstens kann Uridin als Nucleosid nur über eine Reaktionskette in die Nucleinsäure eingebaut werden, die für die normale Synthese untergeordnete Bedeutung hat, da die Pyrimidinbasen als Orotidinnucleotid phosphoryliert werden, während Orotsäure die direkte Vorstufe für alle Pyrimidin enthaltenden Nucleotide ist. Zweitens sind alle im Stoffwechsel entstehenden Abbauprodukte des Uridins radioaktiv markiert, d.h. auch die Ribose, so daß H-3 auf diese Weise auch in ganz andersartige Zellkomponenten eingebaut werden kann. Damit sind viele störende Effekte verbunden. Bei der verwendeten markierten Orotsäure dagegen entstehen nach anfänglicher schneller Ausscheidung über die Niere in erster Linie Urazil enthaltene Nucleotide (17). Außerdem tritt bei der Umwandlung von Urazil zu Thymin die Methylgruppe an die Stelle des Tritium, so daß keine Markierung der DNS stattfindet. Die Radioaktivität fand sich auch nach achtstündiger Inkorporationszeit nur in der RNS. Somit erwies sich Orotsäure - 5 - H-3 als eine ausgezeichnet verwendbare Vorstufe für die Markierung von RNS.

Für den ausschließlichen Einbau in die DNS ist von vornherein nur radioaktiv markiertes Thymidin geeignet. Hier muß also ein Nucleosid verwendet werden, obwohl bekannt ist, daß es nicht über den hauptsächlich

beschrittenen Syntheseweg in die DNS gelangen kann. Aus ähnlicher Gründen, wie sie beim durchmarkierten Uridin diskutiert wurden, ist Thymidin, das die Radioaktivität in der Methylgruppe enthält, schlechter brauchbar als Thymidin - 2 - C-14. Thymidin kann wie Uridin durch eine Nucleosid-Phosphorylase in Thymin und Phosphoribosid gespalten werden. (20). An der Methylgruppe markiertes Thymin hat als Stoffwechselprodukte unter anderem Glucose und Alanin zur Folge (9). Das Kohlenstoffatom in Position 2 des Thyminringes kann dagegen durch Rattenleberhomogenate binnen einer Stunde zu 98% in CO_2 überführt werden (3). Dies ist ein Endprodukt des Stoffwechsels, das sehr rasch ausgeschieden wird. Eine Radiomarkierung von RNS oder weiterer Zellkomponenten tritt nach der Verabfolgung von Thymidin - 2 - C-14 nicht in Erscheinung.

Weitere Versuche sollten zeigen, in welcher Weise die Zunahme der spezif. Aktivitäten der beiden RNS-Fraktionen und der DNS von der Zeit abhängt, die zwischen der Injektion der Vorstufen und dem Töten der Tiere vergeht. In Anbetracht der hohen Kosten der radioaktiv markierten Substanzen und der aufwendigen Aufarbeitungsverfahren konnten diese Untersuchungen nur an einer begrenzten Zahl von Tieren durchgeführt werden. Dennoch ergab sich ein Verlauf der Kurven, der die Inkorporationsrate veranschaulicht. Zwar verhindern die aufgetretenen Streuungen eine detaillierte mathematische Analyse, aber sie gestatten, die einzelnen Phasen des Verlaufs der Inkorporationen abzulesen.

Bei der DNS steigt die spezif. Aktivität im Verlauf der ersten Stunde steil an. Danach erfolgt kein weiterer Einbau. Die Radioaktivität in den säurelöslichen Bestandteilen der Leber, die als Anhaltspunkt für die Markierung des sogenannten "Pools" gelten kann, sinkt innerhalb der ersten Stunde auf sehr geringe Werte ab. Somit kann angenommen werden, daß nur kurze Zeit nach der Applikation einbaufähige Vorstufen zur Verfügung stehen.

Komplizierter ist die Deutung der Kurven, die den Einbau in die beiden RNS-Fraktionen wiedergeben. Auch sie steigen im Anfang steil an und verlaufen dann flacher und linear. Bei der Kern-RNS führt die Richtungsänderung zu einem scharfen Abknicken der Kurve, das sich nicht so erklären läßt, wie bei der DNS und wahrscheinlich auch bei der cytoplasmatischen RNS, nämlich mit dem Absinken der Konzentrationen der markierten Vorstufen im Pool. Aus der Kurve, die die Radiomarkierung der säurelöslichen Bestandteile wiedergibt, ist dieses Absinken nicht deutlich abzulesen. Da die erste Messung jedoch 20 Minuten nach der Applikation vorgenommen wurde, könnte schon während dieser Zeit ein steiler Abfall eingetreten sein. Andererseits ist aus den Meßwerten nicht zu erkennen, in welcher Form die Radioaktivität vorliegt. Es wäre durchaus denkbar, daß das Verschwinden einbaufähiger Orotsäure deshalb nicht zur Verminderung der Radioaktivität führt, weil daraus andere, schlechter einzubauende Metaboliten entstehen, die noch radioaktiv markiert sind und langsam eliminiert werden.

Die wichtigste Frage bei der RNS ergibt sich jedoch aus den großen Unterschieden der spezif. Aktivität zwischen den beiden Fraktionen. Kann aus der ca. 10-fach höheren Markierung der Kern-RNS auf eine höhere Synthesegeschwindigkeit geschlossen werden? Selbst wenn in beiden Fraktionen die Synthese der RNS gleich schnell verläuft, würde sich daraus für die Kern-RNS, da sie nur 10 bis 20 % der Gesamt-RNS ausmacht, ein wesentlich höherer Umsatz ergeben. Das allein könnte schon erklären, daß die spezif. Aktivität in der zweiten Einbauphase rascher ansteigt als in der cytoplasmatischen RNS. Der steile Anstieg der Markierung der Kern-RNS, der in den ersten 20 Minuten beobachtet wird, läßt sich so dagegen nicht deuten. Hier muß noch ein anderer Faktor eine Rolle spielen. Entweder es entsteht in wenigen Minuten im Stoffwechsel aus einer gut verwertbaren

Vorstufe eine, die schlechter eingebaut wird, oder die Kern-RNS und ihre Bildung können nicht als einheitlich betrachtet werden. Es könnte in ihr eine Fraktion enthalten sein, die viel schneller gebildet wird, so daß sie bezüglich der Markierung schon innerhalb weniger Minuten mit dem Angebot der Vorstufen ins Gleichgewicht kommt. Dazu würden die wenigen Minuten nach der Injektion ausreichen, in denen das Angebot sehr hoch ist, und das würde den steilen Anstieg zu der hohen spezif. Aktivität bedingen. Die Kurve würde dann umknicken, wenn nur noch die Zunahme zur Auswirkung gelangt, die durch den Einbau in die langsamer synthetisierten Fraktionen zustande kommt, denen nun außerdem weniger von den markierten Vorstufen zur Verfügung steht.

Der lineare Anstieg in der zweiten Phase des Einbaues in die Fraktionen der RNS zeigt, daß die Markierung der Vorstufen sich in diesem Zeitabschnitt nicht wesentlich ändert, was mit den gefundenen Werten in den säurelöslichen Bestandteilen in Einklang steht.

Wiederholt ist die Ansicht vertreten worden, so von Goldstein und Plaut (13), daß große Teile der RNS im Kern gebildet werden und von dort ins Plasma übertreten. Dieser Vorgang wäre für pharmakologische Untersuchungen von großem Interesse, weil die Prozesse, die für den Übergang der RNS aus dem Kern ins Plasma verantwortlich sind, als Angriffspunkt für pharmakologische Wirkungen in Betracht gezogen werden müßten. Aus den Resultaten der eigenen Untersuchungen läßt sich jedoch kein Anhaltspunkt ableiten, der diese Hypothese unterstützen würde. Bei der großen Differenz in den Mengenverhältnissen zwischen Kern-RNS und cytoplasmatischer RNS wäre zu erwarten, daß mit dem Anstieg der spezif. Aktivität in der cytoplasmatischen RNS zumindest im Verlauf von vier bis acht Stunden ein Abfall der spezif. Aktivität der Kern-RNS einhergeht. Die Kern-RNS müßte andernfalls

einen außerordentlich raschen Umsatz haben, und es müßten während der gesamten Versuchsdauer von 8 Stunden so viel markierte Vorstufen im Pool vorhanden sein, daß die spezif. Aktivität dennoch nicht absinkt, sondern sogar steiler ansteigen kann als im Cytoplasma. Auch für diese Annahme finden sich keine ausreichenden experimentellen Hinweise.

Die durch zwölfstündige Futterkarenz hervorgerufenen Veränderungen bestehen in einer Erhöhung der DNS-Konzentration, einer relativen Verminderung der RNS-Menge und einer beschleunigten RNS-Synthese. Da sich Nahrungsentzug in vielfältiger Weise auswirken kann, wird es zunächst nicht möglich sein, die Ursache für diese Veränderungen aus den Daten abzuleiten. In erster Linie ist die Zufuhr von Nährstoffen zur Leber über die Pfortader unterbrochen, wodurch eine Reihe von Stoffwechselveränderungen bedingt ist. Vor allen Dingen werden die Glykogen- und Fettdepots entleert, und auch der Abbau von Protein mag verstärkt sein. Leistungen, die die Leber sonst während der Verdauung zu vollziehen hat, unterbleiben, die Produktion von Gallenflüssigkeit ist geringer. Dazu kommen einschneidende sekundäre Effekte, von denen in den letzten Jahren erst einige näher untersucht wurden. Bekannt ist, daß die Hypophyse verstärkt adrenocorticotropes Hormon (ACTH) abgibt, und dadurch die Nebennierenrinde zur erhöhten Produktion von Glucocorticoiden stimuliert wird. Auch die gesteigerte Abgabe dieser Hormone hat zahlreiche Konsequenzen für den Leberstoffwechsel. Eine von diesen ist die stark erhöhte Bildung von Tryptophanpyrrolase, was sowohl von Maikel, Westermann und Brodie, als auch von Kewitz und Wagner gefunden wurde (27, 21). Bei der Tryptophanpyrrolase handelt es sich um ein Enzym, das einen sogenannten katabolen Stoffwechselvorgang katalysiert. Ein zweites Hormon des Hypophysenvorderlappens, das durch Nahrungsentzug erheblich mehr produziert und abgegeben

wird, ist das somatotrope Hormon (STH) (11,16,29). Dieses Inkret hat sicher primäre Stoffwechselwirkungen, von denen auch die Nucleinsäuren betroffen sind. Ob außerdem noch Auswirkungen auf andere innersekretorische Drüsen vorhanden sind, ist noch nicht sichergestellt. An der regenerierenden Rattenleber findet sich nach Applikation von STH eine Zunahme der Mitosen und dementsprechend eine Beschleunigung der DNS-Synthese (4). Das gleiche soll in der Milzpulpa stattfinden (5). Am isolierten Rattenzwerchfell von hypophysektomierten Tieren ließ sich eine Steigerung der RNS-Synthese nicht nachweisen, obwohl die Protein-Synthese deutlich gesteigert war (28). Welche der zahlreichen Auswirkungen auf den Stoffwechsel zu den beobachteten Veränderungen geführt haben, könnte im gegenwärtigen Stadium der Untersuchungen höchsten zu Spekulationen veranlassen.

Um weitere Einblicke in die Regulation des Stoffwechsels der Nucleinsäuren zu gewinnen, wird es notwendig sein, systematisch den Einfluß der Hormone zu studieren. Damit ist in der vorliegenden Arbeit begonnen worden, indem die Veränderungen nach Adrenalektomie und nach der Injektion eines Glucocorticoides untersucht wurden. P. Feigelson und M. Feigelson erzielten durch Cortison einen geringfügig erhöhten Einbau von Orotsäure - 6 - C-14 in die Rattenleber (8). Eine stärkere Erhöhung der spezif. Aktivität fanden sie, wenn als Vorstufe die Aminosäure Glyzin - 2 - C-14 oder anorganisches P-32 - Phosphat angeboten wurde (7). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die erhöhte Markierung bei einem Angebot von radioaktivem Glyzin oder Phosphat ihre Ursache auch in der Beschleunigung der Synthese von Purinen oder Nucleotiden haben kann. Derartige Veränderungen würden beim Angebot von Orotsäure nicht in Erscheinung treten. Die nach Adrenalektomie aufgetretene Erhöhung der DNS-Konzentration, die durch Prednisolon partiell rückgängig gemacht wird, ließe sich durch die mitosehemmende Wirkung von Glucocorticoiden erklären. Das kommt auch in der Verminderung

der spezif. Aktivität der DNS nach der Prednisolongabe zum Ausdruck. Weniger eindeutig sind die Veränderungen der Einbaurate in die RNS. Nach Entfernung der Nebenniere findet sich eine deutliche Erhöhung der spezif. Aktivität bei der Gesamt-RNS, jedoch nicht bei der cytoplasmatischen RNS. Die spezif. Aktivität der Kern-RNS ist in diesen Versuchen nicht bestimmt worden. Aber es muß angenommen werden, daß die höhere Einbaurate, die aus der Zunahme der Aktivität in der Gesamt-RNS hervorgeht, auf eine beschleunigte Synthese der Kern-RNS zurückzuführen ist. Die Verabfolgung von Prednisolon an adrenalektomierte Tiere wirkt sich deutlich nur in einer Zunahme der spezif. Aktivität der cytoplasmatischen RNS aus.

Ob die Steigerung des RNS-Umsatzes durch Nahrungskarenz und durch Glucocorticoide in einem ursächlichen Zusammenhang stehen, muß offen bleiben bis die Vorgänge, die dafür verantwortlich sind, besser geklärt sind. Auch wird es erst dann möglich sein zu entscheiden, ob die gesteigerte Synthese mancher Enzymeiweiße, die durch Fasten oder durch Glucocorticoide hervorgerufen wird, darauf zurückzuführen ist.

Zusammenfassung

Für Untersuchungen des Nucleinsäurestoffwechsels der Rattenleber wurden Methoden erarbeitet, die neben der Isolierung von hochpolymerer RNS und DNS die Bestimmung der Gesamtmenge und der spezifischen Radioaktivität der Nucleinsäuren gestatten.

Der Einbau von Uridin - H-3, Orotsäure - 5 - H-3, Thymidin - Methyl - H-3 und Thymidin - 2 - C-14 in die Nucleinsäuren wurde geprüft. Es wurde nachgewiesen, daß Orotsäure - 5 - H-3 selektiv in die RNS, Thymidin - 2 - C-14 dagegen ausschließlich in die DNS eingebaut wird. Diese beiden Precursor sind somit für Untersuchungen des Stoffwechsels von RNS und DNS an demselben Tier geeignet. Uridin - H-3 (an allen H - Positionen markiert) und Thymidin - Methyl - H-3 erwiesen sich als für diesen Zweck wenig geeignet, da sie in zahlreiche andere Gewebsfraktionen außer den Nucleinsäuren inkorporiert werden, wodurch die Beurteilung der Meßergebnisse sehr erschwert wird.

Orotsäure - 5 - H-3 markiert die Kern-RNS binnen einer Stunde ungefähr zehnmal so hoch wie die cytoplasmatische RNS. Die Markierungsrate nimmt in beiden Fraktionen innerhalb von acht Stunden zu, wobei die Zunahme in zwei Phasen verläuft.
Die Markierung der DNS durch Thymidin - 2 - C-14 ist nach einer Stunde bereits abgeschlossen.

Nahrungsentzug erhöht die DNS-Konzentration in der Leber und den Einbau von Orotsäure - 5 - H-3 in die RNS. Adrenalektomie vermindert die DNS-Konzentration und verstärkt den Einbau von Orotsäure - 5 - H-3 in die RNS. Prednisolonbehandlung restituiert innerhalb weniger Stunden die DNS-Konzentration dieser Tiere bei gleichzeitig

vermehrtem Einbau von Thymidin - 2 - C-14 in die DNS und Orotsäure - 5 - H-3 in die cytoplasmatische RNS. Die Aktivität der Tryptophanpyrrolase ist von der Prednisolon - Dosis und der Dauer der Behandlung abhängig.

Die Versuchsresultate wurden anhand von Befunden anderer Autoren diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. Barrenscheen, H.K. und Peham, A.: Z. Physiol. Chem. 272, 81 (1941 - 1942)
zitiert nach Ceriotti, G.: J. Biol. Chem. 214, 59 (1954)
2. Burton, K.: Biochem. J. 62, 315 (1956)
3. Canellakis, E.S.: J. Biol. Chem. 221, 315 (1956)
4. Cater, D,B., Holmes, B.E. und Mee, L.K.: Biochem. J. 66, 482(1957)
zitiert nach Voss, H.E. in FERMENTE-HORMONE-VITAMINE, Bd. II, G. Thieme-Verlag Stuttgart, 626 (1960)
5. Cavallero, C.: Acta Allerg., Kopenh., 6, Suppl. 3 (1953)
zitiert nach Voss, H.E. in FERMENTE - HORMONE - VITAMINE, Bd. II, G. Thieme-Verlag Stuttgart, 633 (1960)
6. Dingman, W. und Sporn, M.B.: Biochim. Biophys. Acta 61, 164 (1962)
7. Feigelson, M., Gross, P.R. und Feigelson, P.: Biochim. Biophys. Acta 55, 495 (1962)
8. Feigelson, P. und Feigelson, M.: J. Biol. Chem. 238, 1073, (1963)
9. Fink, K., Cline, R.E., Henderson, R.B. und Fink, R.M.: J. Biol. Chem. 221, 425 (1956)
10. Fleck, A. und Munro, H.N.: Biochim. Biophys. Acta 55, 571 (1962)
11. Frantz, A.G. und Rabkin, M.T.: New Eng. J. Med. 271, 1375 (1964)
zitiert nach Marks, V., Howorth, N. und Greenwood, F.C.: Nature (Lond.) 208, 686 (1965)

12. Georgiev, G.P. und Mantieva, V.L., Biokhimiya 27, 805 (1962)
zitiert nach Kirby, K.S. in Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. III, Academic Press, New York u. London, 25 (1964)
13. Goldstein, L. und Plaut, W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 40, 874 (1955)
14. Hiatt, H.H.: J. Mol. Biol. 5, 217 (1962)
15. Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. und Striebich, M.J.: J. Biol. Chem. 196, 111 (1952)
zitiert nach Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der Physiologisch - und Pathologisch - Chemischen Analyse, Bd. II, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 573 (1955)
16. Hunter, W.M.,und Greenwood, F.C.: Brit. Med. J. i, 804 (1964)
zitiert nach Marks, V., Howorth, N. und Greenwood, F.C.: Nature (Lond.) 208, 686 (1965)
17. Hurlbert, R.B. und Potter, V.R.: J. Biol. Chem. 195, 257 (1952)
18. Hutchison, W.C., Downie, E.D. und Munro, H.N.: Biochim. Biophys. Acta 55, 561 (1962)
19. Hutchison, W.C. und Munro, H.N.: Analyst 86, 768 (1961)
20. Kalckar, H.M.: J. Biol. Chem. 167, 477 (1947)
21. Kewitz, H. und Wagner, H.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 15, 1 (1965)
22. Kidson, C., Kirby, K.S. und Ralph, R.K.: J. Mol. Biol. 7, 312 (1963)
23. Kirby, K.S.: Biochem. J. 64, 405 (1956)
24. Kirby, K.S.: Biochem. J. 66, 495 (1957)
25. Kirby, K.S.: Biochem. J. 70, 261 (1958)

26. Kirby, K.S.: in Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. III Academic Press, New York and London, 1 (1964)
27. Maikel, R.P., Westermann, E.O. und Brodie, B.B.: J. Pharmacol. and Exper. Ther. 134, 167 (1961)
28. Martin, T.E. und Young, F.G.: Nature (Lond.) 208, 684 (1965)
29. Roth, J., Glick, S.M., Yalow, R.S. und Berson, S.A.: Metabolism 12, 577 (1963) zitiert nach Marks, V., Howorth, N. und Greenwood, F.C.: Nature (Lond.) 208 686 (1965)
30. Schmidt, G. und Thannhauser, S.J.: J. Biol. Chem. 161, 83 (1945)
31. Schneider, W.C.: J. Biol. Chem. 161, 293 (1945)
32. Schneider, W.C., Hogeboom, G.H. und Ross, H.E.: J. Nat. Cancer Inst. 10, 977 (1950) zitiert nach Hutchison, W.C. und Munro, H.N.: Analyst 86, 768 (1961)
33. Talvitie, N.A., Perez, E. und Illustre, D.P.: Anal. Chem. 34, 866 (1962)
34. Tamm, C., Hodes, M.E. und Chargaff, E.: J. Biol. Chem. 195, 49 (1952)
35. Wagner, H.: Inaug. Diss. Vet. Med. Fak. Freie Universität Berlin (1964)

Herrn Professor Dr. H. Kewitz danke ich sehr herzlich dafür, daß er mir durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die großzügige Förderung und wissenschaftliche Anleitung die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat. Herrn Dr. H. Wagner bin ich für alle Anregungen und die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sehr dankbar.

Lebenslauf

Am 16. 5. 1935 wurde ich, Otto Pleul, als Sohn des praktischen Arztes Dr. Walther Pleul und seiner Ehefrau Anna in Plauen i. Vogtl. geboren. Von September 1941 bis Juli 1947 besuchte ich in Plauen die Grundschule. Anschließend besuchte ich die Landesheimoberschule Pforta in Schulpforta, an der ich 1952 das Abitur ablegte. Nach bestandenem Abitur studierte ich von September 1952 bis Juli 1956 an der Martin-Luther-Universität Halle Schulmusik und war anschließend bis Juli 1957 in Bad Dürrenberg, Krs. Merseburg, als Lehrer tätig. Vom Wintersemester 1957/58 an studierte ich an der Freien Universität Berlin Veterinärmedizin. Nach der tierärztlichen Vorprüfung im Oktober 1959 bestand ich auch die tierärztliche Prüfung im März 1963 an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin. Die tierärztliche Praktikantenzeit absolvierte ich an der Klinik für Klauentiere und Tiergeburtshilfe der Freien Universität Berlin vom 1. 4. bis zum 30. 9. 1963. Am 1. 10. 1963 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt. Seitdem bin ich als wiss. Mitarbeiter am Institut für Veterinär-Pharmakologie der Freien Universität Berlin tätig.